UNIVERSITE DE DIJON

institut de biologie appliquée à la nutrition et à l'alimentation

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE CELLULAIRE

ANALYSE DU CUIVRE DANS LES PRODUITS LAITIERS

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences en vue d'obtenir le grade de Docteur - Ingénieur par

JEAN-LUC ILARI
INGENIEUR I.B.A.N.A.

Soutenue le 19 Fév. 1973 devant la Commission d'Examen

Président : M.C. BARON

Examinateurs : M.R. MICHEL

M.J. KEILLING

N° d'inscription du C.N.R.S. : A.O.8043.

UNIVERSITE DE DIJON

institut de biologie appliquée à la nutrition et à l'alimentation

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE CELLULAIRE

ANALYSE DU CUIVRE DANS LES PRODUITS LAITIERS

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences en vue d'obtenir le grade de Docteur - Ingénieur par

JEAN-LUC ILARI
INGENIEUR I.B.A.N.A.

Soutenue le 19 Fév. 1973 devant la Commission d'Examen

Président : M.C. BARON

Examinateurs : M.R. MICHEL

M.J. KEILLING

N° d'inscription du C.N.R.S. : A.O.8043.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A notre Maître, Monsieur le Professeur Raymond MICHEL, qui a su nous accueillir, nous guider, nous former et nous comprendre au cours des quatre années que nous avons passées dans son laboratoire. Nous lui devons beaucoup et en sommes très conscient.

Qu'il accepte aujourd'hui l'expression de notre profonde gratitude et de nos sentiments reconnaissants.

A Monsieur le Professeur Christian BARON, pour son extrême bienveillance. En tant qu'élève, nous avons toujours trouvé auprès de lui la compréhension et l'intérêt que nous en attendions. Nous le remercions de bien vouloir présider cette thèse et juger notre modeste travail.

A Monsieur le Professeur Jean KEILLING, Directeur de l'Institut de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation, pour sa sollicitude et son aide précieuse. Ses cours et ses conseils nous ont toujours conduit à une logique puissante et nous ont souvent offert un appui moral. Instigateur de nos travaux, nous nous félicitons de l'intérêt qu'il leur a toujours accordé.

Je tiens à remercier :

-Mes amis du laboratoire de Biochimie cellulaire pour leur aide constante.

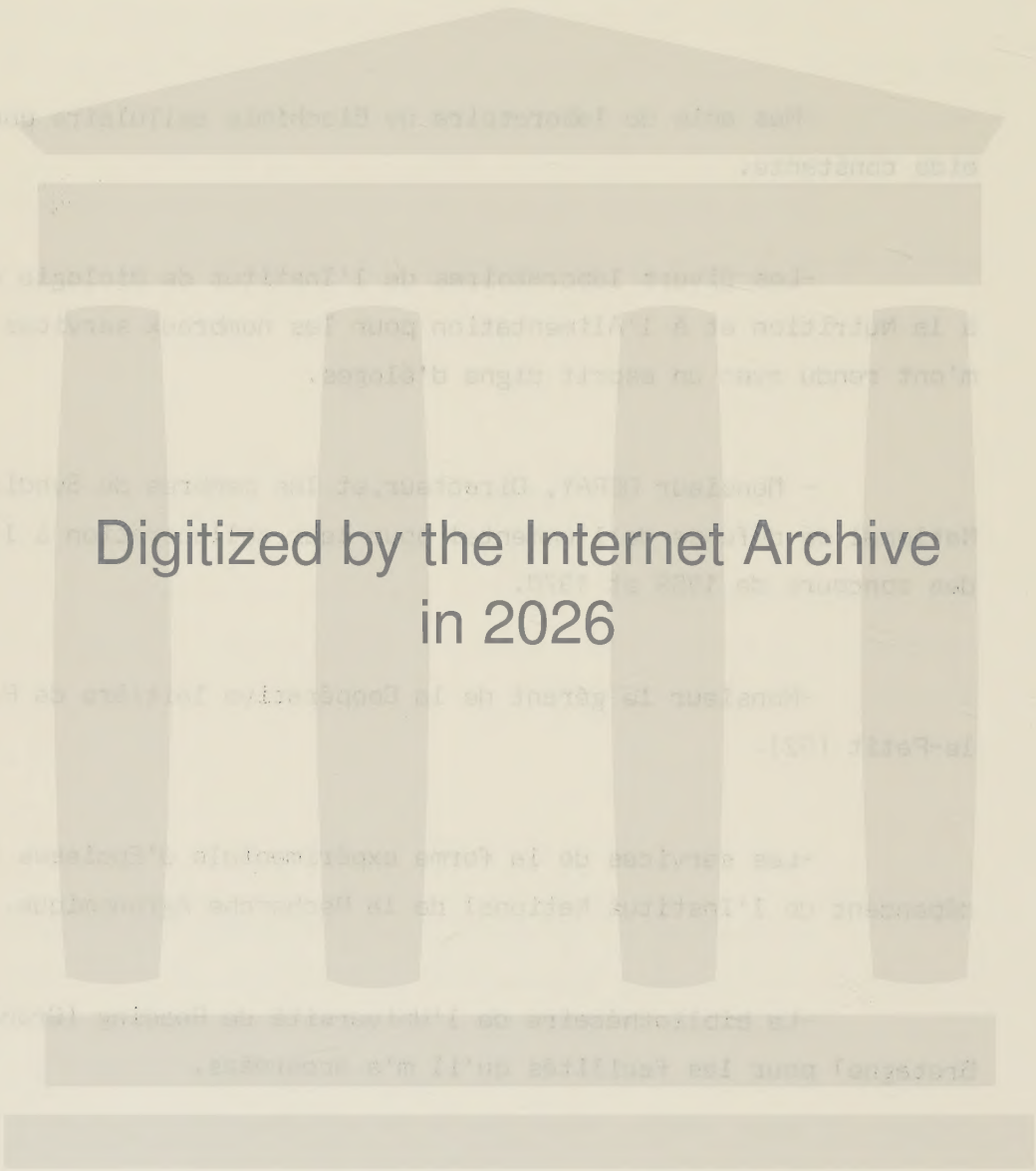
-Les divers laboratoires de l'Institut de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation pour les nombreux services qu'ils m'ont rendu avec un esprit digne d'éloges.

- Monsieur DERAY, Directeur,et les membres du Syndicat National de défense de l'emmental pour leur collaboration à l'occasion des concours de 1969 et 1970.

-Monsieur le gérant de la Coopérative laitière de Percey-le-Petit (52).

-Les services de la ferme expérimentale d'Epoisses (21), dépendant de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

-Le bibliothécaire de l'Université de Reading (Grande-Bretagne) pour les facilités qu'il m'a accordées.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549828_0009

SOMMAIRE

INTRODUCTION..... 1

OBJET DU TRAVAIL..... 4

1ère PARTIE - Dosage du cuivre dans les produits alimentaires par spéctrophotométrie d'absorption atomique..... 5

CHAPITRE I - Appareil et étalonnages..... 6

A - L'appareil

1 - Ses caractéristiques..... 6

2 - Etude des divers modules..... 7

B - Etalonnage de l'appareil..... 12

1 - Caractéristiques propres au cuivre..... 12

2 - Constantes opératoires..... 13

3 - Interférences..... 14

4 - Etalonnages en solution pure..... 14

5 - Etalonnages de mélanges..... 16

CHAPITRE II - Applications analytiques à divers produits alimentaires 22

1 - Dosage du cuivre dans les conserves de légumes verts.... 22

2 - Dosage du cuivre dans les extraits de viande..... 25

3 - Dosage du cuivre dans divers fromages..... 26

4 - Conclusions..... 28

CHAPITRE III - Dosage du cuivre dans le lait..... 29

1 - Choix de la méthode de dosage..... 29

2 - Mode opératoire suivi et résultats..... 30

CHAPITRE IV - Séparation de diverses fractions du lait et dosage de leur teneur en cuivre..... 33

1 - Séparation des protéines du lait. Historique..... 33

2 - Matériel et méthodes utilisés..... 35

3 - Description des séries d'expériences. Séries I à VI.... 37

4 - Résultats des séries d'expériences. Séries I à VI..... 46

5 - Discussion sur les diverses méthodes employées et définition d'une technique d'analyse reproductible..... 57

6 - Discussion des résultats du dosage du cuivre..... 63

2ème PARTIE - Application de ces résultats au domaine alimentaire..... 65

CHAPITRE I - Teneur en cuivre des fromages présentés aux Concours de l'emmental de 1969 et 1970..... 65

CHAPITRE II - Méthodes d'appréciation de la qualité organoleptique des fromages..... 72

A - Critères d'appréciation..... 72

B - Etude des tests..... 73

C - Résultats..... 74

CHAPITRE III - Définition d'une relation entre la teneur en cuivre et le goût..... 78

A - Résultats groupés pour 1969..... 79

B - Résultats groupés pour 1970..... 80

C - Conclusions pour les deux années..... 82

CHAPITRE IV - Explications technologique et biochimique de l'influence du cuivre en fromagerie d'emmental.....85

A - Processus d'enrichissement en fabrication. Répartition du cuivre..... 86

B - Inconvénients de l'utilisation du cuivre..... 90

1 - Phénomènes de corrosion du cuivre..... 90

2 - Accidents technologiques dus au cuivre.. 92

C - Influence biochimique du cuivre sur la maturation..... 95

1 - Les facteurs de l'affinage..... 95

2 - Les produits de l'affinage..... 96

3 - Discussion sur l'action du cuivre..... 97

4 - Conclusion.....103

CONCLUSION GENERALE.....105

BIBLIOGRAPHIE.....107

INTRODUCTION

Bien avant qu'ait été définie la structure chimique des protéines, leur association avec certains métaux, dont le cuivre, a été reconnue. Ainsi la présence de cuivre dans le pigment respiratoire des escargots, l'hémocyanine, a été mise en évidence par HARLESS dès 1847.

Les progrès des techniques de séparation et de purification des protéines ont ces dernières années permis de connaître l'importance et le mode d'action des métalloprotéines dans la majorité des cycles biologiques. Ce mode d'action se caractérise par d'innombrables possibilités au niveau des catalyses enzymatiques.

Parmi les divers métaux liés aux protéines, le cuivre se différencie par quelques caractéristiques particulières. Ses modes d'affinité avec les protéines proviennent des propriétés chimiques suivantes : la constitution de son cortège électronique ainsi que sa valeur d'électropositivité font du cuivre un excellent accepteur de doublets électroniques qui peuvent être portés aussi bien par l'azote, l'oxygène, ou le soufre protéique. Ses propriétés oxydantes, liées à la valeur du potentiel rédox du système Cu^{++}/Cu^{+}, expliquent sa réactivité très facile avec les groupements SH des protéines. Enfin le caractère acide de l'ion Cu^{++} le rend très apte à réagir avec les groupements aminés libres des protéines.

Il en résulte qu'en milieu biologique il n'existe pas de cuivre inorganique libre. Cet élément est en effet immédiatement chélaté par les composés protéiques du milieu.

Toutefois, et en fonction des diverses propriétés que nous venons de définir, il est logique de penser que les diverses protéines vont se répartir suivant une échelle d'affinité pour le cation cuprique. Ainsi, et d'après la force des liaisons engagées, ont été différenciées les "métalloprotéines", pour lesquelles la réaction métal + protéines ⟶ métalloprotéines, est irréversible, et les "complexes métalloprotéiques", pour lesquels la réversibilité est possible avec récupération de la protéine native.

Parmi les manifestations évidentes de ces phénomènes, nous pouvons

citer la très classique réaction du biuret, présentant la sélection de l'ion Cu^{++} par les liaisons peptidiques d'une façon irréversible. Ou bien le rôle joué par le cuivre dans la cytochrome oxydase, accepteur terminal des électrons de la chaîne respiratoire, ou encore la tyrosinase, polyphényloxydase à 4 atomes de cuivre où le cuivre permet l'action enzymatique.

Mais tous les intermédiaires entre ces divers modes d'action et de liaison des protéines à cuivre existent dans les milieux biologiques, où le cuivre est partout présent sous diverses formes de stockage, de transport et d'activation enzymatique. Avec les progrès de nouvelles techniques d'analyse, telles la résonance paramagnétique électronique et la spectrophotométrie d'absorption atomique, l'évidence constitutive du cuivre a été prouvée d'une façon générale, au cours de ces dix dernières années, pour une cinquantaine de protéines. Mais le problème des divers modes d'action n'a pas encore été résolu. Parfois, le cuivre agit comme un métal lourd, et à ce titre, joue un rôle d'inhibiteur enzymatique dans un grand nombre de réactions. Parfois, il modifie la réactivité dans le sens de l'activation, et en particulier pour toutes les protéines enzymatiques dont le cuivre est un effecteur indispensable...

L'étude des structures de ces diverses protéines tissulaires à cuivre (comme l'hépatocupréine) et de ces enzymes à cuivre (comme l'ascorbate oxydase) ainsi que de leurs divers modes d'action, présentent actuellement une voie de recherche importante et pluridisciplinaire visant à définir non seulement l'utilité du cuivre dans les systèmes biologiques, mais encore son métabolisme, sa biochimie et sa toxicité.

L'action enzymatique oxydante très forte du cuivre sur le lait et les produits laitiers appartient maintenant à l'histoire. Ainsi, le cuivre, considéré traditionnellement comme le métal le plus pratique en chaudronnerie et en technologie alimentaire, a été banni de l'industrie laitière au profit d'alliages métalliques plus élaborés, tels les aciers inoxydables.

Mais la multitude des modes d'action du cuivre, et sa répartition quasi générale sous diverses formes chimiques, conduit à penser que son action sur les produits laitiers n'est peut-être pas aussi simple qu'une seule action d'oxydation catalytique, mais fait appel aussi à d'autres mécanismes biochimiques beaucoup plus élaborés.

Un milieu biologique de choix, comme le lait, a déjà été largement analysé. Son cuivre de "contamination extérieure" est bien connu, de même que son cuivre global "constitutif". Toutefois, les études à plus fine échelle

de cet élément dans un milieu aussi complexe n'ont pratiquement pas été réalisées. L'éventail de sa composition protéique présente un intérêt supplémentaire. Nous nous sommes donc attachés à apporter notre contribution dans ce domaine, en essayant de mieux définir la répartition du cuivre naturel dans le lait frais considéré comme le produit d'un métabolisme et comme la base d'une industrie alimentaire.

Nous verrons ainsi comment le cuivre, par sa répartition sur l'équipement enzymatique du milieu, peut entraîner deux types d'actions biochimiques : la modification des réactions enzymatiques en fermentation, et plus directement la modification des caractères organoleptiques.

OBJET DU TRAVAIL

Notre travail a d'abord donné lieu à la mise au point d'une technique analytique de dosage du cuivre par spectrophotométrie d'absorption atomique. Les divers traitements de la matière biologique préalables au dosage proprement dit de l'élément cuivre, ont entraîné de nombreux étalonnages. Nous avons appliqué cette méthode à diverses catégories de produits alimentaires, pour lesquels la connaissance des teneurs présentait un intérêt analytique ou technologique. Le lait naturel a ensuite retenu toute notre attention. Avant le dosage de l'élément cuivre, nous avons réalisé diverses séparations : celle des constituants majeurs du lait, puis celle des protéines solubles du lactosérum par chromatographie sur colonne. La teneur en cuivre a été déterminée pour le lait frais entier sans apport extérieur de contamination en cuivre, et pour les différentes fractions obtenues.

Les premiers résultats du dosage du cuivre sur divers fromages ont montré l'intérêt de l'application systématique de la méthode à de fortes séries de meules de fromage d'emmental. En fonction des résultats obtenus, nous avons étudié le phénomène de l'enrichissement technologique du produit laitier en cours de fabrication. L'évolution actuelle et générale de la fabrication des fromages d'emmental, depuis la cuve de fabrication en cuivre vers la cuve de fabrication en acier inoxydable, nous a conduit à évaluer la qualité organoleptique des divers fromages. Ainsi nous avons mis en évidence l'influence du cuivre sur la flaveur des fromages d'emmental. L'étude biochimique de ce phénomène a été entrevue. Elle a permis d'expliquer, au moins partiellement, l'action du cuivre sur les mécanismes biochimiques très complexes de la maturation et de l'affinage des fromages d'emmental.

PREMIERE PARTIE

DOSAGE DU CUIVRE DANS DIVERS PRODUITS ALIMENTAIRES PAR SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE

L'absorption atomique est une technique d'analyse basée sur le principe fondamental suivant : lorsqu'on place, sur le trajet d'une radiation électromagnétique de longueur d'onde définie des atomes du même élément que les atomes émetteurs, ces atomes absorbent une partie de l'énergie électromagnétique en passant à l'état excité par un phénomène de résonance. Il s'ensuit une absorption relative de l'émission sélectionnée, proportionnelle à la quantité d'élément présent sur le trajet optique qui est mesurable à l'aide d'une cellule photoélectrique. M. PINTA (VI) a récemment réalisé une revue complète des problèmes liés à cette technique et à ses diverses applications, à laquelle on pourra éventuellement se référer. De notre côté nous présenterons tout de même l'appareil que nous avons utilisé et son étalonnage, de façon à mieux définir les principaux résultats que nous avons obtenus.

CHAPITRE I

APPAREIL ET ETALONNAGES

A - L'APPAREIL

I - Ses caractéristiques

L'appareil que nous avons utilisé est un spectrophotomètre ZEISS. Il permet des utilisations multiples grâce à l'interchangeabilité de certains modules. Les deux modules de base, pour tous les types d'utilisation, sont le monochromateur et le galvanomètre.

Le montage en spectrophotométrie de flamme se caractérise par cet enchaînement :

a - un premier module où sont concentrés la lampe, le vaporisateur, les régulateurs de débit gazeux et la flamme,qui est particulier à l'utilisation en absorption atomique.

b - le monochromateur, équipé de dispositif de sélection des longueurs d'onde et de l'épaisseur de la fente

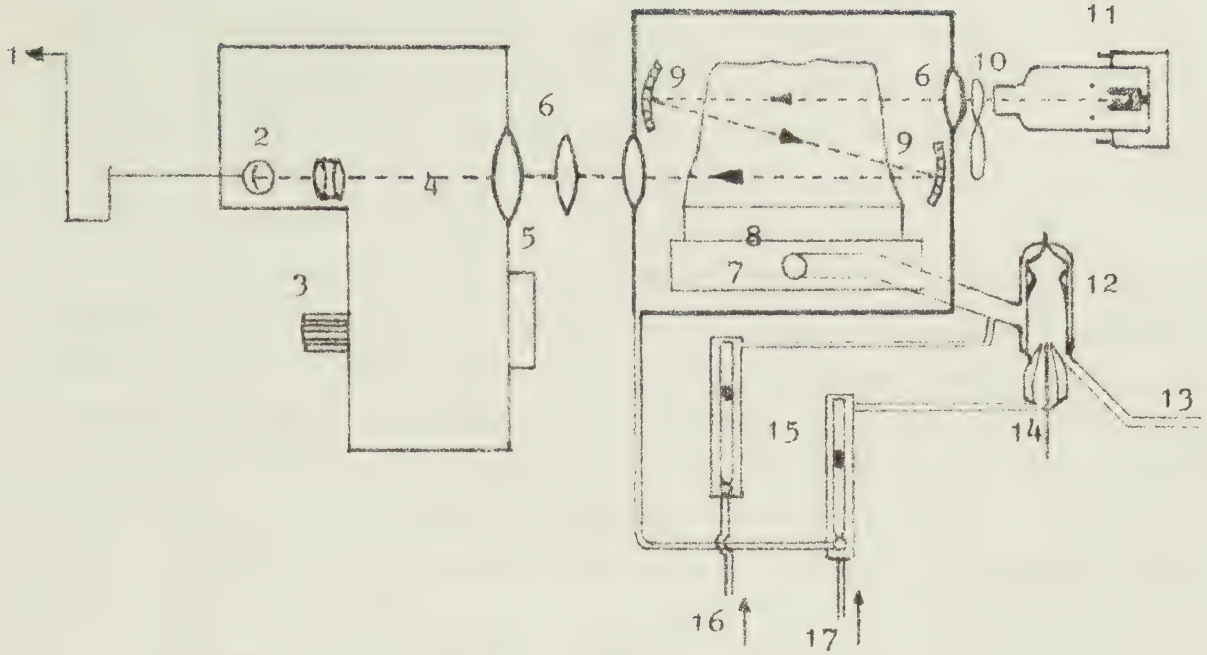
c - le photorécepteur

d - le galvanomètre

e - l'enregistreur.

L'alimentation est assurée par des bouteilles de gaz comprimés, et des détendeurs appropriés permettant de règler les pressions aux valeurs utiles.

La figure suivante représente l'organisation des trois premiers modules.



1 - Courant de sortie
2 - Récepteur photoélectrique
3 - Réglage de la longueur d'onde
4 - Monochromateur
5 - Réglage de la largeur de la fente
6 - Lentilles
7 - Corps du brûleur
8 - Becs du brûleur
9 - Miroirs concaves
10 - Diaphragme oscillant
11 - Lampe à cathode creuse
12 - Chambre de pulvérisation
13 - Evacuation du surplus des solutions
14 - Buse d'aspiration et de pulvérisation
15 - Débimètres
16 - arrivée du gaz
17 - Arrivée d'air

Représentation schématique des trois premiers modules de l'appareil utilisé pour l'absorption atomique.

II - Etude des divers modules

a - La lampe

Il s'agit d'une lampe à cathode creuse. Le principe de ces lampes dérive de celui des ampoules de GEISSLER, où la pression des gaz est du même ordre de grandeur.

Dans ces ampoules à gaz raréfié, la cathode reçoit un afflux d'ions positifs, obtenus par l'ionisation du gaz. Les atomes ionisés atteignent une énergie suffisante pour arracher ceux du métal de la cathode.

Comme cette cathode est creuse, l'atmosphère atomique reste confinée à l'intérieur de la cavité et les atomes métalliques y subissent divers états d'excitation, états pour lesquels ils émettent les radiations correspondantes.

Donc, si on applique entre la cathode et l'anode de la lampe une différence de potentiel suffisante, l'intérieur de la cathode devient lumineux et émet des radiations électromagnétiques. La couleur de la lueur obtenue dépend du gaz de remplissage de la lampe (par exemple orange pour le néon).

Mais le spectre, obtenu dans la direction définie par l'axe de la cathode creuse, est un spectre de raies comprenant les raies spécifiques du métal dont est constituée la cathode. On peut donc dire que le spectre "double" obtenu présente les raies du gaz composant l'atmosphère de la lampe, et les raies dues à l'excitation des atomes métalliques de la cathode par le bombardement ionique.

Ces caractéristiques des lampes expliquent qu'elles peuvent être réalisées soit pour un seul élément, soit pour plusieurs éléments métalliques, dans le cas où la cathode est constituée d'un alliage particulier. Par exemple une lampe à cathode en laiton permet de doser aussi bien Cu que Zn.

Les lampes ZEISS sont étalonnées à la fabrication. Elles présentent les principales qualités requises, à savoir :

- la stabilité d'émission nécessaire à l'obtention d'une bonne reproductibilité
- l'absence de fond continu d'émission, ce qui permet un bon isolement des raies spécifiques du métal et accroît la sensibilité.
- la production de raies étroites et d'intensité élevée, facilement isolées et mesurées.

Ces faits sont mis en évidence par le spectre de la lampe au cuivre représentée sur la figure suivante.

Cette lampe est alimentée en courant d'intensité constante, stabilisé à plus de 1 ‰. Elle supporte une intensité maximum de 25 mA. Sa raie la plus sensible est à 3 247 Å et sa mise en régime ne nécessite pas plus de 5 minutes.

Elle possède un système de fixation original qui permet un excellent centrage de la direction d'émission, dans l'axe optique du monochromateur.

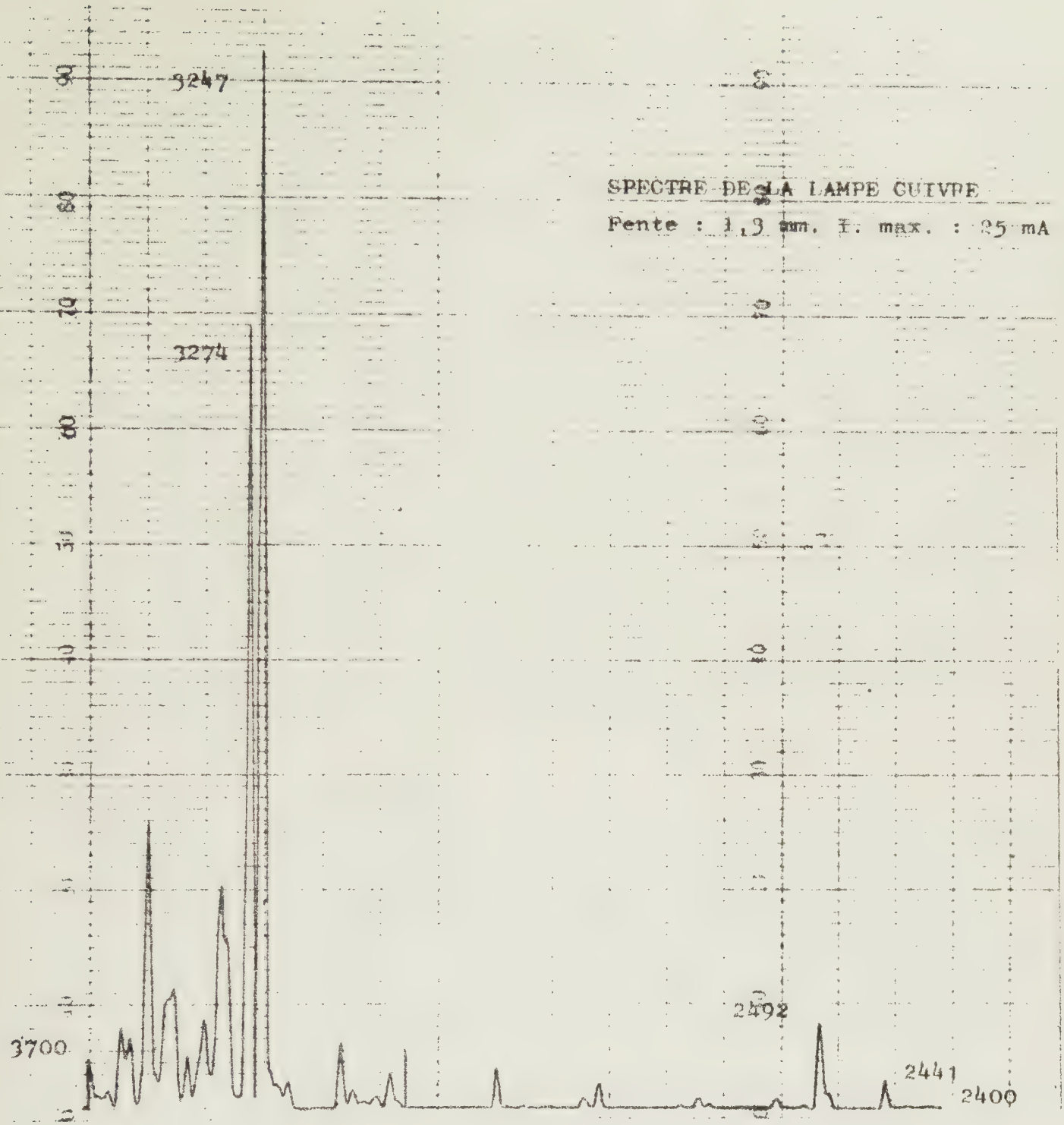
Certaines lampes d'éléments différents présentent cependant une forte dérive. C'est le cas de la lampe au calcium que nous avons utilisée aussi. Il convient d'en tenir compte dans le cas de mesures de longue durée.

b - Le vaporisateur

Il s'agit d'un système de nébulisation pneumatique qui utilise un courant gazeux de débit élevé tangentiel au liquide à vaporiser.

Ce nébulisateur utilise aussi le courant gazeux pour l'aspiration des solutions à doser, par l'intermédiaire d'une buse.

Comme le faisceau lumineux qui traverse la flamme est étroit, il devient très important d'obtenir un nébulisat de gouttelettes de diamètre constant. Le vaporisateur est surmonté par une chambre de condensation



Spectre de la lampe cuivre

en verre, où les particules vaporisées de trop forte taille sont éliminées. Seule une fraction représentant 4 % du produit aspiré atteint, dans ces conditions, le brûleur.

Par suite de sa conception, ce système possède d'autres avantages :

- il fournit un débit constant, sous réserve d'être nettoyé régulièrement
- il permet d'obtenir au niveau du brûleur, un nébulisat fin et homogène
- il est réalisé en matériel inoxydable, ce qui évite les risques d'attaque par les solutions acides.

Les régulateurs de débit gazeux, placés en avant de l'appareillage, permettent une lecture facile des pressions gazeuses. Par le jeu des soupapes de réglage, il est possible d'obtenir une flamme constante pour toutes les expérimentations. Néanmoins, le nébulisateur paraît, à la lumière de nos expériences, comme le facteur de variation le plus important de l'appareil. En effet, son principe, théoriquement parfait pour des solutions vraies, ne s'adapte pas aussi bien aux produits et aux solutions "biologiques". Seule la minéralisation préalable des échantillons permet d'éviter le risque d'erreur dû à un éventuel colmatage de la buse d'aspiration, phénomène que nous avons rencontré lors de nos expériences.

c - Le brûleur

Entièrement réalisé en acier inoxydable, le brûleur est composé de 16 becs de 1,2 mm de diamètre, répartis sur une longueur de 50 mm. Le nettoyage et le démontage sont faciles, quoique peu fréquents.

La position du brûleur dans une chambre de combustion le protège des agents extérieurs. Cette chambre se trouve limitée par des vitres de verre réfractaire qui permettent l'observation de la flamme et arrêtent le rayonnement U.V. biocide.

De plus, cette chambre est balayée par un courant d'air ascendant qui isole la flamme des parois et évite aussi sa pollution par l'air du laboratoire. Ces dispositions suppriment aussi les dangers de retour de flamme.

d - La flamme

La flamme obtenue correspond aux dimensions du brûleur, soit 50 X 1,2 mm environ. C'est en son sein qu'ont lieu un certain nombre de phénomènes caractéristiques très importants pour la méthode :

- la vaporisation du solvant, favorisée par la finesse de la nébulisation, se trouve réalisée instantanément dans la flamme, sans entraîner de perturbations.

- La fusion et l'ébullition des composés métalliques exigent une température élevée, qui est réalisée et pousse les minéralisations dans la flamme jusqu'à l'ébullition.
- La dissociation moléculaire, très souvent nécessaire, est obtenue de façon constante dans les gammes de concentration des dosages. Si on s'adresse à de trop fortes concentrations, la dissociation n'est plus totale, et ce fait perturbe le dosage.
- L'ionisation de certains atomes. L'excitation dans la flamme peut être suffisante pour ioniser certains atomes, ce qui fausse les mesures ; heureusement cela ne se produit pas pour les concentrations habituelles. Dans l'appareil ZEISS, la modulation du rayonnement lumineux supprime cet effet néfaste.

Il faut préciser aussi à propos de la flamme qu'elle est traversée trois fois par le rayonnement émis par la lampe. Un tel dispositif, que nous avons schématisé, utilise un système de deux miroirs et donne d'excellents résultats avec un spectrophotomètre monofaisceau.

Ce triple passage permet d'éviter le réglage vertical du brûleur qui s'avère inutile car la sensibilité obtenue reste toujours voisine du maximum expérimental.

Ce fait constitue un avantage non négligeable : il est ainsi possible d'analyser divers éléments métalliques les uns après les autres sans règlage particulier. Les lampes à multiéléments couplés peuvent accroître encore la rapidité des mesures.

Enfin, il faut signaler que la flamme peut être due à la combustion de divers gaz, en fonction des températures et des conditions oxydoréductrices désirées.

Sur l'appareil ZEISS, on peut réaliser les flammes suivantes :

- Air comprimé-propane (température maximum : 1925°)
- Air comprimé-gaz de ville (" " : 1900 à 1950°)
- Air comprimé-hydrogène (" " : 2050°)
- Air comprimé-acétylène (" " : 2325°)
- Protoxyde d'azote-acétylène (" " : 2955°)

En fait, toutes nos mesures ont été réalisées avec la flamme la plus courante obtenue à l'aide du mélange air comprimé-acétylène, et qui donne en son point le plus chaud une température de 2325°C.

e - Le monochromateur

Il est destiné à ne laisser parvenir à l'élément photosensible que la seule longueur d'onde choisie pour la mesure. Il s'agit du monochromateur à prisme, type M 4 Q III ZEISS. Cet appareil est équipé d'un système de

compensation de température qui évite toute dérive thermique. Le champ spectral utile va de 1850 Å à 25000 Å. Sa justesse de lecture varie de 0,5 à 3 Å en fonction de la longueur d'onde considérée.

Pour le cuivre, on sélectionne sur le monochromateur :

- la longueur d'onde : 3247 Å
- la largeur de fente : 0,03 mm

Ce monochromateur est équipé d'un boitier récepteur photosensible. Pour l'intervalle 2000 - 6000 Å, il s'agit d'un photomultiplicateur de nomenclature P.E.V. (type 1 P 38). Le photorécepteur transmet une impulsion électrique à un appareil indicateur (galvanomètre).

f - Le galvanomètre et l'enregistreur

Le galvanomètre est un appareil très sensible avec une échelle projetée de 40 cm. Son intervalle total d'amplification couvre le rapport de 1 à 15 000. Il possède trois échelons d'amortissement, auxquels correspondent des temps de stabilisation de 1, 5 et 10 secondes.

Enfin, ce galvanomètre est relié à un enregistreur potentiométrique SERVOGOR fabriqué par GOERZ ELECTRO. Cet enregistreur est caractérisé par une précision et une sensibilité de réponse élevée, une faible influence de la température ambiante, et une largeur utile de 200 mm pour le papier d'enregistrement.

B - ETALONNAGE DE L'APPAREIL

On procède à l'étalonnage de l'appareil avec une solution réalisée à partir d'un sel minéral cuivrique pur, en l'occurence le sulfate de cuivre.

1 - Caractéristiques propres au cuivre

L'élément cuivre a un poids atomique de 63,54. Son point de fusion est défini à 1083°C. Son point d'ébullition atteint la température élevée de 2336°C.

L'atome élémentaire possède un cortège de 29 électrons, répartis suivant la formule : $1\,S^2$, $2\,S^2\,2\,P^6$, $3\,S^2\,3\,P^6\,3\,D^{10}$, $4\,S^1$

Sous l'effet d'un apport d'énergie externe, les diverses raies d'émission correspondant à cette structure chimique, et absorbées par l'appareil en fonctionnement sont les suivantes :

Raies d'absorption

Longueur d'onde exprimée en Å	Sensibilité en ppm pour 1 % d'absorption
2165	2
2244	140
2442	800
2492	14
3247	0,2
3274	0,4

Il s'ensuit que la raie la plus sensible correspond à la longueur d'onde 3247 Å. C'est celle qui a été retenue pour tous nos dosages de l'élément cuivre.

2 - Constantes opératoires

La lampe utilisée est une lampe à cathode creuse qui émet uniquement le spectre du cuivre. Nous avons déjà présenté son enregistrement spectral. Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- carburant : acétylène
- comburant : air
- température maximum obtenue : 2325°C
- pression d'entrée de l'air : 1 kg/cm^2
- pression d'entrée de l'acétylène : 0,5 kg/cm^2
- pression de pulvérisation : 1 kg/cm^2
- consommation de l'air : 10 litres /minute
- consommation d'acétylène : 0,6 à 0,9 litre/minute
- consommation de solution échantillon : 2 à 3 ml/minute
- durée d'allumage de la lampe avant les mesures : 5 minutes
- largeur de fente du monochromateur : 0,03 mm
- enregistreur : la vitesse normale de déroulement du papier est de 30 cm/minute. L'échelle de mesure retenue est 0-10 mV. On a tenté une expansion d'échelle sur le calibre 0-5 mV, mais les oscillations de l'enregistreur sont trop fortes et nous avons dû renoncer à cette expansion.

Pour toutes les mesures, le galvanomètre est placé sur la position d'amortissement III. Il s'ensuit que le temps minimum de stabilisation est de 10 secondes. Donc chaque mesure dure au minimum 10 secondes.

3 - Les interférences

Le problème a déjà été soulevé pour l'étude des milieux biologiques dont la complexité laissait entrevoir des interférences possibles. GIRARD (15) a montré que, dans le cas du cuivre, il n'y avait pas d'interférence avec les ions suivants :

- 5,30 g/litre de Cl^-
- 0,050 g/litre de PO_4^{---}
- 3,20 g/litre de Na^+
- 0,20 g/litre de K^+
- 0,10 g/litre de Ca^{++}
- 0,02 g/litre de Mg^{++}

et 0,10 mg/litre de Cu^{++}, par rapport à la solution initiale à 0,10 mg/litre. De plus, le pH n'amène aucune perturbation car le brûleur est en acier inoxydable.

PINTA M. (VI) cite des chiffres de concentrations ioniques vingt fois plus élevées sans interférences sur les dosages. Les seules interférences que nous avons rencontrées sont dues à la présence de protéines dans la solution à doser. Nous avons supprimé les risques d'erreur soit en les éliminant par du CCl_3COOH, soit en les détruisant par HNO_3 bouillant. Les essais pour lesquels une minéralisation préalable n'a pas été réalisée ont été suffisamment dilués pour éviter les risques d'interférences.

4 - Etalonnage de solutions pures de SO_4Cu

Le dosage du cuivre dans un milieu complexe s'opère par comparaison avec une gamme étalon réalisée à partir d'un sel pur. Le choix de ce sel doit se porter sur un produit très pur et dont la solubilité dans l'eau est relativement grande. Certains auteurs proposent à cet effet une solution obtenue par la quantité minimale nécessaire d'HCl R.P. sur du cuivre pur en tournure. Nous lui avons préféré, pour des raisons de commodité et de reproductibilité, le sulfate de cuivre Merck, qui est d'ailleurs recommandé pour cet usage par les établissements ZEISS.

Ce sulfate de cuivre cristallisé pour analyses, de formule $CuSO_4$, 5 H_2O, de masse moléculaire 249,68, possède les critères de pureté suivants :

- teneur en $CuSO_4$, 5 H_2O, par iodométrie	minimum	99 %
- matières insolubles dans l'eau .	maximum	0,005 %
- chlorures (Cl^-)	"	0,0005%
- azote total (N)	"	0,004 %
- Nickel (Ni)	"	0,002 %
- Fer (Fe)	"	0,005 %
- Zinc (Zn)	"	0,015 %
- Matières non précipitables par H_2S en sulfates	"	0,1 %

Solution étalon mère

On prépare une solution étalon mère de forte concentration,en fait 100 parties par million (100 ppm), ou autrement dit 100 mg/litre dans H_2O bidistillée. Le cuivre ayant un poids atomique de 63,54 g, et le sulfate de 249,68, pour obtenir une solution contenant 0,100 g de cuivre par litre, il faut peser $\frac{0,100 \times 249,68}{63,54}$, c'est-à-dire, 0,393 g de $CuSO_4$ Merck.

Cette opération est réalisée à la balance de précision Mettler. On dissout la quantité nécessaire de cristaux dans une fiole jaugée de un litre, avec de l'eau bidistillée à 20° C. Une bonne agitation permet la dissolution totale et l'homogénéisation. La solution étalon obtenue, ou solution mère, est répartie dans des flacons de polyéthylène de 250 ml et placée au réfrigérateur. Cette solution est à la base de tous les étalons préparés extemporanément.

Première gamme étalon

La gamme étalon est préparée peu de temps avant l'emploi des solutions, par la méthode des dilutions successives dans l'eau bidistillée.

La gamme préparée comporte toujours les concentrations suivantes : 0,1 - 0,2 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 10,0 - 50,0 ppm, obtenues à partir de la solution à 100 ppm.

Il faut bien entendu prendre soin d'utiliser des pipettes et des godets préalablement rincés à l'eau bidistillée. Les résultats sont donnés dans le tableau suivant :

Produit	Concentration en ppm	Lecture au galvanomètre
H_2O bidistillée	-	0,000
Gamme étalon $CuSO_4$ Merck dans H_2O bidistillée	0,1	0,000
	0,5	0,008
	1,0	0,017
	2,0	0,030
	5,0	0,082
	10,0	0,175
	20,0	0,345
	50,0	0,810
	100,0	1,36

Ce tableau a permis le tracé d'une courbe d'étalonnage du cuivre en phase aqueuse. En fait, cette gamme n'est pas satisfaisante, surtout parce que la plus faible concentration, 0,1 ppm, n'est pas dosable. Cependant, on constate une bonne linéarité de l'absorption en fonction de la concentration, de la valeur 0,5 ppm à la valeur 50,0 ppm, puisque la courbe d'étalonnage est linéaire.

5 - Etalonnage de mélanges

a - En présence d'acide trichloracétique

Pour les besoins des dosages, nous avons été amenés à réaliser une deuxième gamme étalon de $CuSO_4$ Merck, dans une solution à 4 % de CCl_3COOH Merck pour analyses.

On a ainsi par cette courbe d'étalonnage éliminé les interférences possibles dues à la présence du CCl_3COOH dans le mode opératoire. De plus, la gamme étalon préparée a été conservée longtemps au réfrigérateur, ce qui a permis d'étudier son évolution. Les résultats des mesures sont donnés dans le tableau suivant

Concentration en ppm	Lecture au galvanomètre		
	Temps 0	Après 6 jours	Après 56 jours
H_2O bidistillée	0,000	0,000	0,000
0,1	0,003	0,002	0,002
0,2	0,005	0,003	0,003
0,5	0,007	0,007	0,007
1	0,013	0,015	0,013
2	0,028	0,030	0,025
5	0,070	0,074	0,060
10	0,147	0,149	0,120
20	0,288	0,303	0,245
50	0,680	0,725	0,610

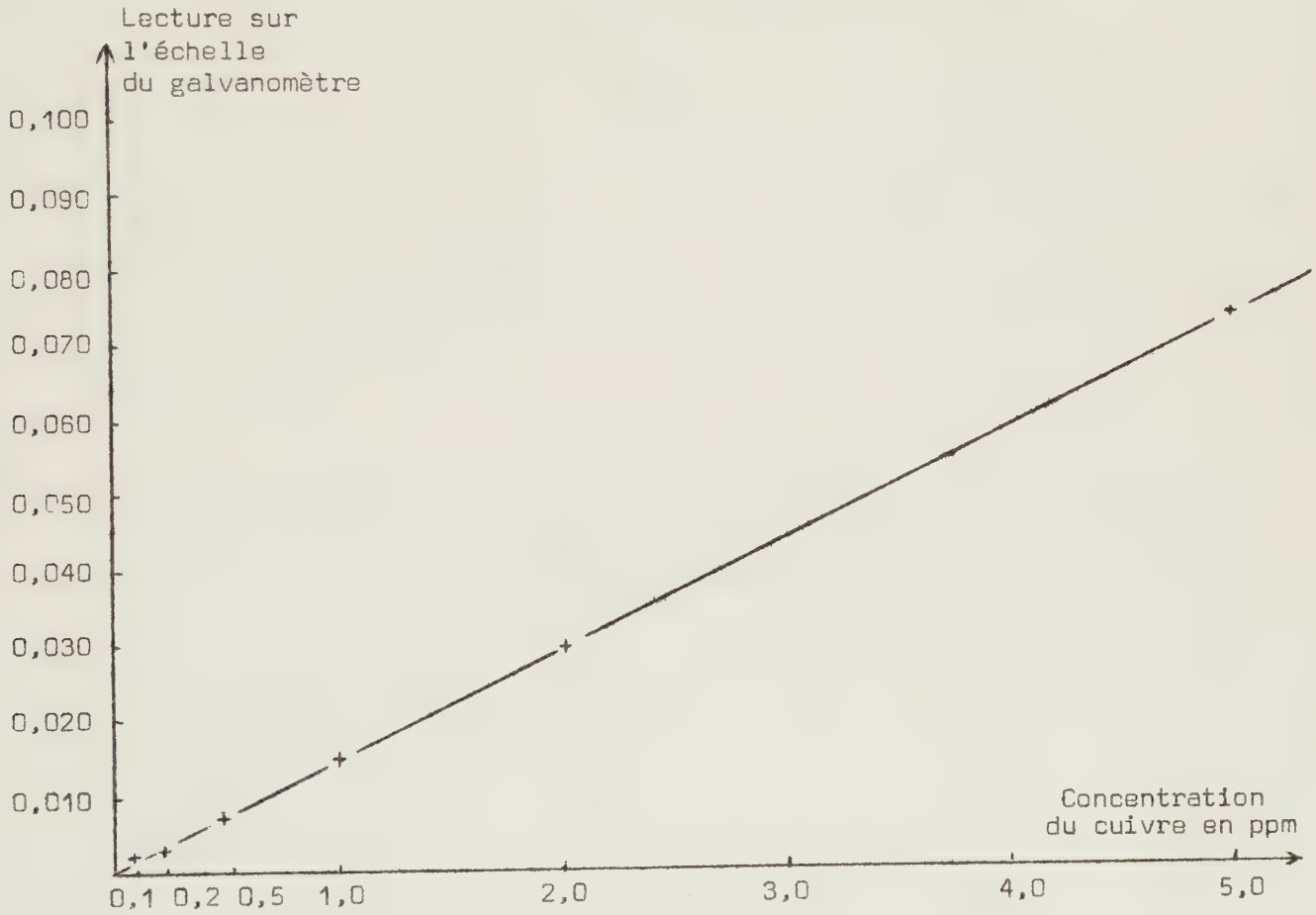
Ce tableau fait apparaître une bonne concordance entre les deux mesures réalisées à faible intervalle de temps, tout de suite après la préparation de la gamme et après 6 jours au réfrigérateur.

Il faut considérer que les valeurs lues sur le galvanomètre pour des concentrations inférieures à 0,2 ppm ne sont pas significatives par suite des limites propres à l'appareillage.

Néanmoins ces deux courbes sont semblables et mettent en évidence la linéarité de l'absorption en fonction des diverses concentrations de la gamme.

La troisième mesure, réalisée 2 mois plus tard sur la même gamme, diffère sensiblement des précédentes puisque la concentration en cuivre a varié, surtout pour les valeurs élevées. On peut penser que la partie du cuivre disparue s'est fixée sur les parois ou a précipité dans les récipients contenant les diverses solutions.

Cette série de mesures a permis de définir une courbe d'étalonnage. Cette courbe représentée sur la figure, présente une excellente linéarité. Nous nous y sommes rapportés pour nos dosages ultérieurs, mais nous avons constamment réalisé des étalonnages témoins afin de contrôler la bonne marche de l'appareillage.



Courbe étalon en présence de T.C.A.

A cet effet, nous avons effectué, à partir de la concentration mère de 100 ppm de cuivre, et aux intervalles de temps donnés dans le tableau suivant, quelques essais d'absorption sur les trois concentrations 0,5 ; 5 ; 50 ppm dans CCl_3COOH à 4 %.

Vérification de l'appareillage

Concentration	Lecture au galvanomètre			
	t = 0	t = 50 jours	t = 70 jours	t = 100 jours
0,5 ppm	0,007	0,007	0,007	0,007
5 ppm	0,074	0,075	0,074	0,076
50 ppm	0,725	0,740	0,720	0,715

Les données du tableau mettent en évidence la bonne reproductibilité de l'appareillage puisque les erreurs de manipulation suffisent à expliquer les très faibles variations, inférieures à 1/50 en valeur relative, même pour les fortes concentrations.

b - Etalonnage en présence de méthylisobutylcétone

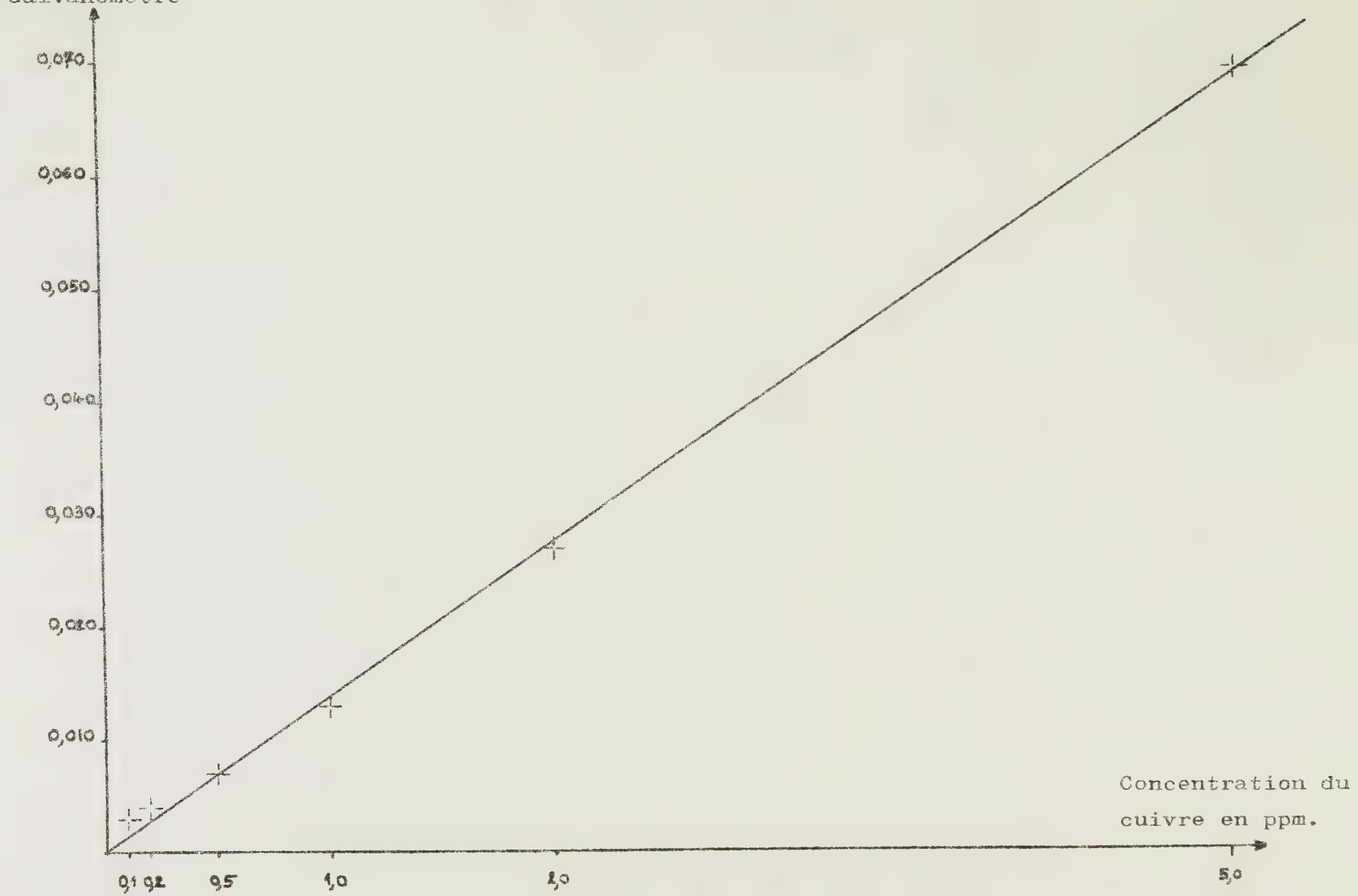
La mode opératoire rendu nécessaire par le dosage du cuivre dans des produits plus complexes, tels que les produits laitiers, fait intervenir comme nous le verrons plus loin un solvant organique constitué par de la méthylisobutylcétone (M.I.C.). Nous avons été amenés à réaliser une gamme étalon à partir de solutions aqueuses de $CuSO_4$ saturées par un égal volume de M.I.C. Merck, dont la concentration maximale en cuivre est très faible, de l'ordre de 0,100 mg/litre. Les mesures obtenues sont relevées dans le tableau suivant

Gamme étalon avec M.I.C.

	Concentration du cuivre en ppm	Lecture au galvanomètre
Gamme étalon de $CuSO_4$ saturé par M.I.C.	0,1	0,003
	0,2	0,004
	0,5	0,007
	1,0	0,013
	2,0	0,026
	5,0	0,069
	10,0	0,140
	20,0	0,274
	50,0	0,575

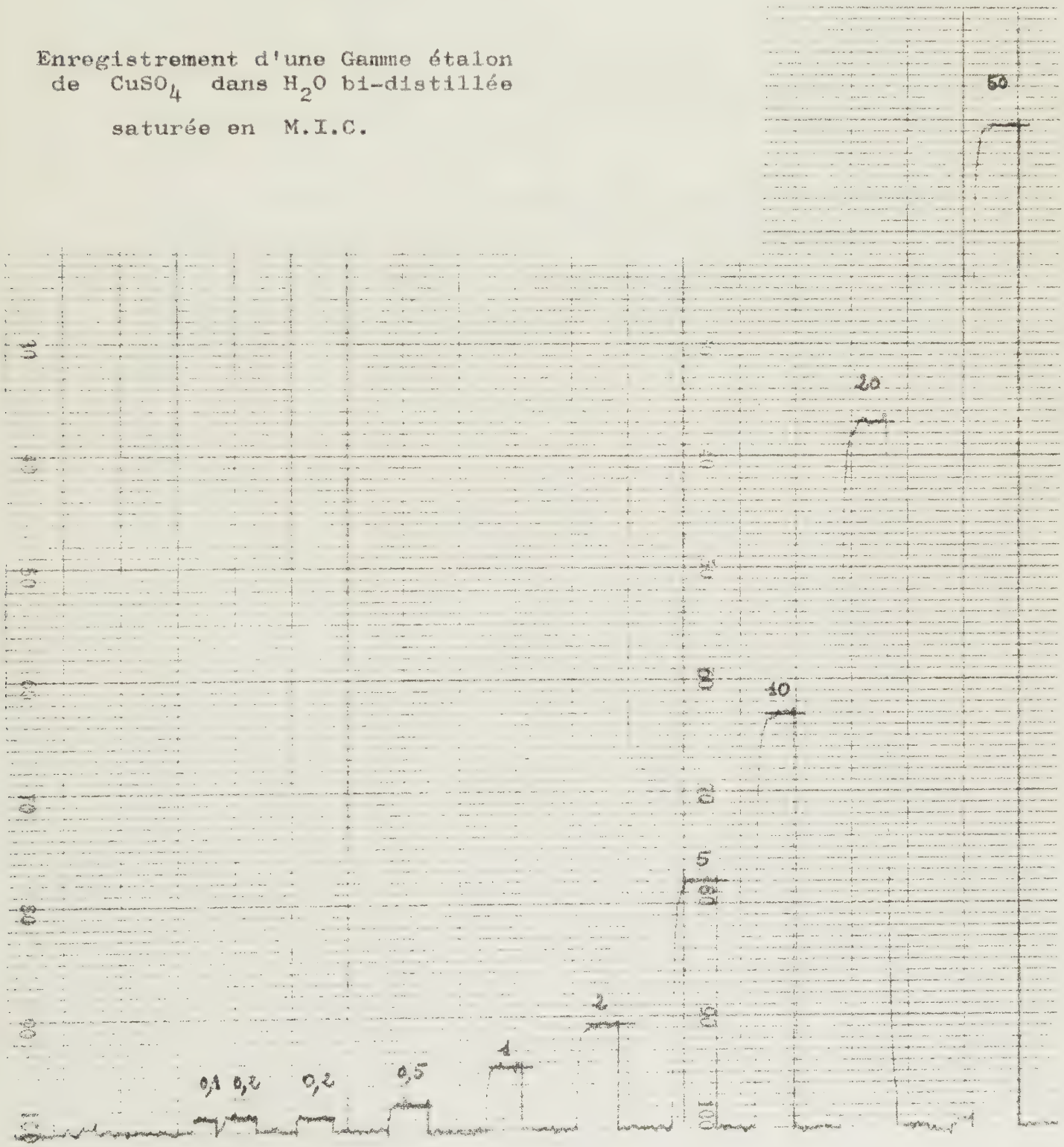
Ce tableau montre à nouveau la bonne linéarité qui existe entre la concentration en phase aqueuse saturée de M.I.C. et l'absorption. Il a permis de tracer une courbe d'étalonnage donnée sur la figure suivante.

Droite d'étalonnage de l'appareil d'absorption atomique



De plus, nous avons procédé en même temps à des enregistrements sur papier. Ces enregistrements permettent de comparer rapidement les résultats obtenus à la courbe d'étalonnage, et aussi d'évaluer les variations éventuelles de l'absorption des étalons de référence.

Enregistrement d'une Gamme étalon de $CuSO_4$ dans H_2O bi-distillée saturée en M.I.C.



On constate que, dans le cas d'une conservation prolongée de la gamme étalon, l'absorption a tendance à s'élever. Il n'est pas impossible que les parois des récipients en verre cèdent du cuivre au cours du vieillissement. Pour l'ensemble de notre travail, nous nous référons à la courbe qui a déjà été définie auparavant.

c - Discussion

Deux remarques s'imposent : d'un côté la présence d'un corps organique dans le milieu permet de rapprocher l'étalonnage des conditions réelles de dosage. De l'autre, on constate une perte de sensibilité due à ce fait.

D'autre part, les solutions d'étalonnage ne peuvent pas se conserver. Il faut donc étalonner l'appareil avant chaque mesure en choisissant une concentration donnée et en ramenant, par une action sur les paramètres extérieurs (largeur de fente, ou mieux amplification du galvanomètre) les valeurs lues à celles données par la courbe d'étalonnage de référence.

CHAPITRE II

APPLICATIONS ANALYTIQUES A DIVERS PRODUITS ALIMENTAIRES

La spectrophotométrie par absorption atomique représente une méthode de choix en raison de sa simplicité de mise en oeuvre pour l'analyse des traces métalliques dans les milieux les plus divers.

Nous avons appliqué cette méthode au dosage du cuivre dans certaines conserves, des extraits de viande et certains fromages.

Une telle étude paraissait intéressante car on pensait lui trouver une application dans le domaine des industries alimentaires, le service des fraudes ayant établi une législation concernant l'utilisation du cuivre comme produit d'addition. Une série d'arrêtés définit les normes à respecter.

- "Il est interdit de placer toutes boissons et denrées destinées à l'alimentation au contact direct du cuivre, exception faite pour les opérations de fabrication ou de conservation".

- Lorsque les conserves ou semi-conserves de légumes et de fruits naturellement verts, destinées à être conservées dans un liquide auront été traitées au sulfate de cuivre dans les conditions prévues par l'article 8 de l'arrêté du 25 mars 1958 (qui prévoit une addition en proportion telle que le produit égoutté ne renferme pas plus de 100 mg/kg), leur étiquetage devra comporter, à la suite de la dénomination de vente, l'un des qualificatifs "reverdis ou recolorés" inscrits de façon apparente pour l'acheteur.

Nous exposerons nos travaux concernant le dosage du cuivre dans les conserves de légumes verts, dans les extraits de viande, enfin dans certains fromages.

1 - Dosage du cuivre dans les conserves de légumes verts

A - Conditions de prélèvement

Le prélèvement nécessite diverses précautions préalables. En particulier, il convient de traiter la verrerie au mélange sulfochromique, puis de la rincer longuement avec de l'eau bidistillée qui ne contienne aucune trace de cuivre. Le volume de la prise d'essai dépend du rapport entre la concentration initiale du corps à doser et la concentration finale nécessaire

à l'analyse. Nous avons prélevé 50 ml dans le cas des liquides et 40 g dans le cas des solides, mais ces valeurs sont en fait arbitraires.

B - Traitements préliminaires au dosage

a - Cas des échantillons liquides.

Il s'agit de prélèvements obtenus à partir des jus de conserves. Suivant leur origine, nous avons utilisé deux méthodes pour l'estimation quantitative du métal.

- le premier procédé consiste en une précipitation par l'acide trichloracétique (TCA) à 4 %. 50 ml de jus sont mélangés à un volume égal de TCA à 8 %. Puis nous agitons et nous laissons reposer 10-15 mn. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 10 mn à 3 000 g ; nous obtenons alors un surnageant très limpide qui est utilisé tel quel pour le dosage.

- Dans certains cas, le jus ayant seulement une faible viscosité, il n'est pas indispensable d'utiliser l'acide TCA. La deuxième méthode nécessite par conséquent une simple centrifugation à 3000 g pendant 10 minutes, pour éliminer les particules et clarifier le jus.

b - Cas des échantillons solides.

Nous nous sommes adressés à des conserves de légumes verts. Après avoir bien nettoyé le couvercle de la boîte, celle-ci est ouverte et les légumes sont égouttés pendant 10 minutes.

Deux méthodes peuvent être utilisées :

- Traitement au TCA : 40 g de légumes égouttés sont broyés très finement au mixer et homogénéisés ; une partie aliquote de l'homogénat obtenu est reprise par une quantité égale de TCA à 8 %, puis après 10 minutes de repos, le mélange est centrifugé à 3 000 g pendant 10 minutes. Il s'avère parfois nécessaire de centrifuger à nouveau le surnageant. Celui-ci est alors nébulisé directement dans l'appareil.

- Traitement par NO_3H : 5,0 g de légumes égouttés sont mis dans un ballon rond, puis 10 ml de NO_3H concentré sont ajoutés. Le ballon est placé dans un bain de sable chauffé par un thermostat, pendant 3 H à ébullition douce. En effet, des essais préliminaires ont montré que durant cette période, 5 g de tissus sont complètement liquéfiés par l'acide bouillant, sans qu'on puisse assurer si la minéralisation est complète.

Le résidu évaporé à sec sous vide est repris par 5 ml d'eau bidistillée, en prenant soin de rincer avec cette eau les parois du flacon. Le liquide ainsi obtenu peut être aspiré directement dans le brûleur du spectrophotomètre.

C - Résultats

Les tableaux suivants résument les différents résultats trouvés par les méthodes précédemment décrites.

Pour montrer la reproductibilité et la précision des mesures, nous avons calculé la moyenne sur une série d'échantillons, et nous avons supplémenté une autre série par une solution de SO_4 Cu de concentration connue.

Détermination du cuivre dans le jus de petits pois

Méthode utilisée	Méthode par simple dilution			Méthode par précipitation au TCA	
Echantillons	Jus ppm	Jus supplémenté par 2 ppm	Jus supplémenté par 1 ppm	Jus ppm	Jus supplémenté par 1 ppm
	1,5	2,9	2,2	0,95	1,8
	1	2,8	2,8	1	1,9
	1,5	3,2	2,0	0,80	1,5
	1	3	1,9	0,85	1,7
Valeur moyenne	1,25	2,97	1,97	0,90	1,72
% retrouvé		91	90		90

Détermination du cuivre dans les petits pois égouttés

Méthode utilisée	Méthode de digestion nitrique			Méthode après homogénéisation et précipitation au TCA	
Echantillons	Pois étouttés ppm	Pois supplémentés par 1 ppm	Pois supplémentés par 0,5 ppm	Pois égoutés ppm	Pois supplémentés par 0,5 ppm
	2,60	3,60	3,00	1,60	2,10
	2,85	3,80	3,25	1,50	1,90
	2,70	3,70	3,30	1,50	2,00
	2,65	3,70	3,15	1,40	2,00
	2,85	3,80	3,20	1,50	1,90
Valeur moyenne	2,75	3,72	3,20	1,50	1,90
% retrouvé		99	99		95

Teneur en cuivre de différents légumes verts en conserve

Echantillons	Lecture au galvanomètre	Facteur de dilution	Concentration en ppm
Jus de flageolets	0,004	2	0,55
Flageolets	0,003	4	0,95
Jus de haricots	0,005	2	0,75
Haricots	0,006	4	1,60
Jus de laitues	0,002	2	0,25
Coeurs de laitues	0,002	4	0,55
Petits pois d'exportation	0,006	4	1,60
Jus de petits pois	0,007	2	1,00
Epinards	0,004	4	1,10
Jus d'épinards	0,003	2	0,40
Epinards reverdis	0,011	4	3,00
Jus d'épinards reverdis	0,016	2	2,20

Nous remarquons que les résultats donnés par la méthode de digestion nitrique semblent sensiblement supérieurs à ceux obtenus par l'autre méthode.

Un témoin fait à partir de NO_3H pur ne contenant pas de cuivre, nous permet de conclure que la digestion nitrique facilite une solubilisation plus grande en cuivre. D'autre part, elle évite les pertes dues à de nombreuses manipulations.

La méthode par simple dilution réduit le nombre des opérations et par conséquent, comme nous le constatons donne des résultats plus précis.

Tous les chiffres obtenus pour ces différents légumes verts sont inférieurs aux doses maxima prévues par la législation française. Il en est de même pour les légumes reverdis. Les doses de cuivre trouvées correspondant aux doses ajoutées (très faibles, de l'ordre de 2 g pour 100 l d'eau).

2 - Dosage du cuivre dans les extraits de viande

Nous nous sommes intéressés au produit de marque commerciale "Viandox".

A - Technique expérimentale

Ayant affaire à un produit liquide, riche en lipides, nous avons préparé les échantillons de la façon suivante : 5 ml de Viandox additionnés

de 5 ml NO_3H concentré sont introduits dans un matras placé sur une rampe chauffante jusqu'à l'obtention d'un résidu sec non carbonisé. Le résidu sec est repris par 5 ml d'eau disitllée et par 5 ml de méthylisobutylcétone et la phase aqueuse aspirée dans le brûleur sert à doser le cuivre ; la phase organique, dans ces conditions, ne contient en effet pas de cuivre.

B - Résultats

Teneur en cuivre dans le Viandox

Echantillon	Quantité prise d'essai	lecture au galvanomètre	lecture sur la courbe	concentration en ppm
Viandox	5 ml	0,023	1,6	1,6
Viandox supplémenté	5 ml	0,080	5,9	5,9

Nous avons supplémenté un échantillon de Viandox à l'aide de 0,5 mg de Cu pour 100 g. Nous l'avons retrouvé en totalité.

C - Discussion

La concentration en cuivre du Viandox paraît donc faible par rapport à certains organes animaux, tel le foie de veau (150 mg de cuivre/kg). Elle est cependant supérieure à la teneur en cuivre de la majorité des viandes. On sait que le Viandox renferme non seulement des extraits de viande, mais aussi des hydrolysats de protéines végétales. Nous avons ainsi retrouvé ce résultat indirectement.

3 - Dosage du cuivre dans les fromages

Le fromage étant un produit solide, il fallait tout d'abord le liquéfier pour pouvoir le doser par spectrophotométrie d'absorption atomique. C'est la raison pour laquelle les divers échantillons de fromages ont été traités par une minéralisation à chaud.

A - Mode opératoire

Les divers échantillons étaient pesés très précisément, et leurs poids respectifs variaient de 0,8 à 1,4 gramme, exactement mesurés au mg près. Nous utilisions à cet effet un petit godet de papier glacé sulfurisé. La minéralisation était conduite par l'acide nitrique R.P. Prolabo pour analyses, à chaud, dans un matras en verre pyrex. Elle était réalisée par 5 ml d'acide bouillant, le col du matras servant de reflux partiel, et suivant la quantité

de pâte présente dans le matras, pouvait durer de 1 H 30 à 4 H. On la considérait comme terminée lorsque le produit se réduisait à une masse visqueuse incolore de faible volume et n'émettant pas de vapeurs. Le résidu était repris par 5 ml d'eau bi-distillée et 5 ml de méthylisobutylcétone (M.I.C.). L'ensemble était violemment agité et laissé au repos pour décantation et séparation des deux phases. Dans ces conditions, seule la phase aqueuse contient du cuivre, et il suffit de l'aspirer dans l'appareil pour réaliser le dosage. Nous avons en effet vérifié que dans ces conditions la phase organique ne contient que le cuivre initial de l'ordre de 0,1 ppm, et que l'acide nitrique utilisé pour la minéralisation, chauffé et repris de la même façon que les échantillons de fromage, était exempt de cuivre.

Pour vérifier la reproductibilité de la méthode et l'homogénéité du produit, certains échantillons ont été dosés en double, triple et même quadruple. Les résultats obtenus, toujours condordants, confirmaient ceux obtenus à l'aide d'une méthode encore plus précise, par KIERMEIER (23) sur 50 échantillons prélevés sur une même meule. Aussi, nous ne donnerons qu'un chiffre dans le tableau de résultats.

B - Résultats

Nous avons réalisé une série de mesures à partir de fromages de gruyère provenant de fruitières et de régions diverses. Le tableau suivant résume les résultats obtenus.

Teneur en cuivre des gruyères

Echantillon et origine	Poids en g.	Lecture au galvanomètre	Lecture sur la courbe	Concentration en ppm
Emmenthal Haute-Marne	1,000	0,021	1,55	7,7
Comté Jura Prénovel	1,333	0,037	2,58	10,1
Comté Jura	1,312	0,044	3,22	12,2
Comté Doubs	0,956	0,031	2,25	11,7
Emmenthal Haute-Saône	0,958	0,047	3,45	18,0
Emmenthal Vosges	0,838	0,003	0,20	1,2

C - Conclusion

Ces divers fromages de gruyère, de types différents (Emmenthal ou Comté) présentent des teneurs en cuivre très variables. On peut expliquer ce

fait en supposant que ce cuivre provient d'un apport extérieur au lait, apport qui varie en fonction du type de fabrication. Seule une variation de technologie de fabrication peut en effet expliquer les différences que nous avons mises en évidence pour deux échantillons d'Emmenthal. On constate que la méthode de dosage s'applique parfaitement à ce type de produits alimentaires, et l'ordre de grandeur des teneurs en cuivre permet une mesure précise et facile après minéralisation.

4 - Conclusion

Pour les diverses catégories de produits alimentaires que nous venons de mentionner, la détermination du cuivre par spectrophotométrie d'absorption atomique se révèle une technique de choix. Son principal intérêt provient non seulement de sa simplicité d'exécution, mais encore de ses qualités exceptionnelles de spécificité, de rapidité et même de sensibilité.

A la lumière des promesses de ces premiers résultats, nous avons été amenés à nous intéresser à d'autres produits alimentaires. En particulier, le lait nous est apparu comme l'élément de base de nos travaux ultérieurs car toute sa technologie, de même que celle des produits laitiers, peut être fortement influencée par le cuivre.

CHAPITRE III

DOSAGE DU CUIVRE DANS LE LAIT

GOLDING et FEILMAN (27) dénonçaient dès 1905 la contamination du lait par le cuivre. Depuis,de nombreux chercheurs ont essayé de définir non seulement la concentration du cuivre "naturel" ou "contaminé", mais encore sa distribution et le mécanisme de son activité catalytique. Le problème présente encore beaucoup de points obscurs, comme on peut s'en rendre compte à la lecture de la revue présentée par HAASE et DUNKLEY (17). Nous avons essayé de définir le contenu et la répartition du cuivre naturel dans le lait de vache de la race montbéliarde, race laitière de production de fromage d'Emmenthal. Nous nous attacherons donc dans ce paragraphe plutôt au cuivre naturel ; les phénomènes de contamination directe et indirecte seront en effet développés plus loins, lorsque nous envisagerons les aspects technologiques.

1 - Choix de la méthode de dosage

Les méthodes classiques de dosage du cuivre dans divers liquides sont basées sur une technique colorimétrique. Après une extraction et une minéralisation éventuelle plus ou moins délicates dans leur réalisation et leur conception, le cuivre extrait peut être dosé colorimétriquement par action, soit de l'éthylxanthate de potassium, soit de la dithizone, soit du diéthyldithiocarbamate de sodium. Toutes ces méthodes sont assez précises et elles ont été largement utilisées. Plus tard ALIFAX et BEJAMBES (1) ont proposé une adaptation de la méthode que VENTURA et WHITE (42) avaient appliquée au sérum humain. Néanmoins, cette méthode intéressante par son application et sa réalisation relativement pratique, a dû être délaissée pour des méthodes plus récentes et surtout plus précises et plus rapides. Ces autres méthodes sont toujours fondées sur un principe colorimétrique. SMITH (37) a défini deux procédures rapides qui évitaient la minéralisation préalable. Ses résultats ont été contestés par ARMSTRONG et DILL (2) qui ont mis en évidence les variations dues à la présence du carotène qui est

naturellement présent dans la phase lipidique du lait. BERTOLANI et GAVIOLI (6) présentent même les fortes variations trouvées dans leurs résultats par deux méthodes colorimétriques, et expriment l'idée que la comparaison n'en est pas significative. De leur côté, VAN DE BOGART et BEINERT (40) ont donné une méthode générale pour le dosage du fer et du cuivre dans le matériel biologique, mais son application au lait paraît longue et fastidieuse. SAMUELSON (35) a présenté récemment une étude par analyse d'activation. Ses résultats sont satisfaisants. Les techniques d'analyse par le cuivre radioactif préconisées par KING (27) présentaient aussi un intérêt certain. DUNKLEY (14) utilise de son côté une technique de minéralisation par voie humide et une détermination colorimétrique finale.

Nous nous sommes adressés à une technique qui permette le dosage immédiat de très nombreux échantillons. Aussi, comme les méthodes colorimétriques présentaient à ce propos un gros inconvénient, nous nous sommes fixés finalement sur la méthode de spectrophotométrie par absorption atomique.

Le problème restait toujours celui de la minéralisation préalable au dosage, que nous avons réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites déjà pour les extraits de viande et les étalonnages réalisés à cet effet s'appliquent donc aux déterminations dont la description suit.

2 - Mode opératoire et résultats

Les échantillons de lait étaient prélevés de la façon la plus minutieuse possible à la ferme d'Epoisses, station modèle de l'I.N.R.A. Avant chaque prélèvement, qui a lieu chaque fois à la traite de 16 heures, les pis des vaches étaient soigneusement nettoyés avec de l'eau stérile pour enlever toute trace de souillure. Le lait obtenu par traite mécanique pneumatique était recueilli dans un seau en aluminium, pesé, et immédiatement prélevé dans une fiole au préalable soigneusement lavée à l'eau bidistillée. L'échantillon de lait était immédiatement porté dans une enceinte isotherme où il se refroidissait au contact d'eau glacée, et dès son arrivée au laboratoire porté dans une enceinte à + 4°C. Les opérations suivantes consistaient à prendre le pH sur une partie aliquote à 20°C, puis à centrifuger dans une centrifugeuse Jouan pendant 10 minutes à 3000 g. On séparait ainsi la phase lipidique surnageante et le lait écrémé. Par la suite, dans le cas du lait entier ou écrémé, on prélevait 5 ml que l'on faisait passer dans un matras pour la minéralisation. Quant à la crème, on en pesait exactement dans un matras une quantité comprise entre 1 et 2 grammes. Tous ces échantillons étaient traités à chaud par 5 ml de HNO_3 R.P., et la minéralisation était poursuivie jusqu'à l'obtention d'un liquide sirupeux et incolore de

volume inférieur à 1 ml. Généralement, cette minéralisation était obtenue en deux heures, mais sa durés paraît variable en fonction des allures de chauffe. De toute façon, il faut éviter la surchauffe qui amène une carbonisation du produit et qui empêche la suite du dosage. La minéralisation terminée, son produit est repris par l'eau bidistillée et la méthylisobutylcétone. Les deux phases sont violemment agitées et, après décantation, chacune est ajustée à 5 ml et remélangée. La phase supérieure, graisseuse, est composée de méthylisobutylcétone et des résidus des composés organiques, et la phase inférieure aqueuse contient les résidusminéraux. Les deux phases peuvent être dosées séparément quant à leur contenu en cuivre à l'aide du spectrophotomètre d'absorption atomique. Les nombreux essais réalisés ont montré que le cuivre se trouvait toujours dans la phase aqueuse. Nous avons déjà développé la suite de la technique de dosage, ainsi que le procédé d'étalonnage de l'appareil. Les résultats que nous avons obtenus avec des laits de vache de la race Montbéliarde, prélevés comme il a été décrit précédemment, sont présentés dans le tableau ci-dessous.

pH et teneur en cuivre de lait entier de vaches de race Montbéliarde à diverses étapes de la lactation

Vache Toupie, née le 30/3/1967 Race Montbéliarde

1er vêlage le 8/3/1970 2ème vêlage le 7/4/1971	1ère lactation : 2982 l en 284 jours	
	pH	Concentration en cuivre en mg/l ou ppm
Lait du 26/4/1971 19 jours après vêlage	6,55	non dosé
Lait du 10/5/1971 33 jours après vêlage	6,50	0,70
Lait du 3/6/1971 57 jours après vêlage	6,60	0,67

Vache Vermeille, née le 20/2/1968 Race Montbéliarde

1er vêlage le 7/11/1971 2ème vêlage le 12/11/1971	1ère lactation : 4907 l en 275 jours		
	pH	% de corps gras	Concentration en cuivre en mg/l ou ppm
Lait du 11/11/1971 10 jours après vêlage	6,75	7,1	0,67
Lait du 2/12/1971 20 jours après vêlage	6,75	7,4	0,90
Lait du 7/1/1972 46 jours après vêlage	6,75	6,8	0,62

Les résultats trouvés pour le lait de ces deux vaches paraissent élevés par rapport aux chiffres habituellement cités par la littérature. Aussi nous sommes nous attachés à essayer de définir à plus fine échelle la répartition du cuivre sur diverses fractions du lait, puis sur divers composants du lactosérum. Celà nous a conduit à réaliser la séparation des protéines du lactosérum.

CHAPITRE IV

SEPARATION DE DIVERSES FRACTIONS DU LAIT ET DOSAGE DU CUIVRE DANS LES DIVERSES FRACTIONS

Notre but était d'arriver à analyser le phénomène de l'enrichissement en cuivre de certains fromages. Les études préalables étaient donc à réaliser sur du lait frais naturel, de façon à définir les conditions constantes au début du traitement fromager. De plus, l'idée d'une supplémentation artificielle du lait par un sel de cuivre et de son éventuelle répartition permettait de préparer in vitro des conditions en théorie assez semblables à celles rencontrées dans la fabrication des fromages dans des cuves en cuivre.

Les premiers résultats des dosages du cuivre sur les diverses fractions ont mis rapidement en évidence que le caillé de fromagerie possède une affinité pour le cuivre beaucoup plus élevée que les constituants chimiques du lactosérum. Toutefois le lactosérum présente lui aussi un enrichissement et c'est de façon à définir la sélectivité de cet enrichissement pour telle ou telle molécule que notre étude a été entreprise. Le choix du lactosérum se justifie par le fait qu'il présente la plus importante voie de recherche de l'industrie fromagère. Il y a plusieurs raisons à cela : son importance énergétique, sa contenance protéique, l'importance du tonnage gaspillé pour ne citer que les plus communes.

1 - Historique de la séparation des protéines du lactosérum. Solutions envisagées.

Le lait prélevé à la sortie de la mamelle et traité comme il a été décrit précédemment constitue en fait notre produit de base, c'est-à-dire du lait écrèmé. Il nous fallait maintenant trouver un traitement analytique grâce auquel on pouvait à la fois séparer les protéines solubles et doser leur richesse en cuivre.

La séparation des protéines du lait a fait l'objet de nombreux travaux. Dès 1959, PORATH et FLODIN (33) publièrent une nouvelle technique de séparation qui suscita aussitôt l'intérêt de nombreux chercheurs, celle de filtration sur gel, surtout dans le domaine complexe de l'étude des protéines. PREAUX et LONTIE (34) appliquèrent les premiers cette méthode de séparation à un mélange complexe de protéines,en particulier au sérum de lait. Ils définirent ainsi le procédé analytique de séparation de ces protéines, procédé qui, avec quelques modifications de détail, s'applique encore. Toutefois, ce procédé ne donnait pas des préparations pures, comme par exemple permettait de les obtenir la technique des relargages successifs mise au point par de nombreux chercheurs, et en particulier ASCHAFFENBURG en Angleterre. SZUCHET-DERECHIN et JOHNSON (38) diversifièrent le procédé d'utilisation des gels de dextrane en appliquant à la fraction albuminique du lait la technique de séparation par chromatographie sur échangeurs d'ions. Il utilisèrent le D.E.A.E. Séphadex, où les groupements fonctionnels diéthylaminoéthyle $-C_2H_4N^+(C_2H_5)_2$ H jouent le rôle d'échangeurs d'ions. Mais si leurs résultats nous intéressent, ils ne s'appliquent qu'à la fraction albuminique et non à toutes les protéines du lactosérum. MORR et col. (31) de leur côté ont essayé de perfectionner la simple filtration sur gel de dextrane. Ils ont utilisé une centrifugation qui permet de traiter de plus grands volumes. Mais leurs résultats ne s'appliquent cependant pas à notre problème, car la gamme des poids moléculaires des protéines qu'ils séparent n'est pas assez étendue. De plus, ils introduisent dans leur mode opératoire un gradient de concentration de NACl qu'il nous était impossible de réaliser à cause des interférences trop grandes sur les caractéristiques des éluats au cours du dosage du cuivre. CLUSKEY, THOMAS et COULTER (12) ainsi que HIDALGO et HANSEN (19) ont récemment appliqué aux protéines du lait, puis du lactosérum, une technique de précipitation par la carboxyméthylcellulose de sodium. Le complexe formé entre la cellulose et la protéine, quoique stable, ne se prête pas aux déterminations ultérieures que nous voulions réaliser sur ces protéines,car la gamme de pH ne nous convenait pas dans la mesure où elle ne correspondait pas à la gamme des pH habituels de la fromagerie. CERBULIS (11) a mis au point récemment une technique analytique des protéines du lait fondée sur leur solubilisation différentielle dans les divers solvants usuels des graisses (mélange chloroforme-méthanol en particulier). Mais les quantités de protéines solubles dans ces solvants sont trop faibles pour permettre la suite des opérations que nous souhaitions réaliser sur ces protéines, et la méthode ne s'applique pas à toutes les catégories de protéines. MOOR, KENKAN et GOULD (30) ont aussi défini une méthode qui consiste à filtrer sur gel de Séphadex le lait entier après

solubilisation des protéines à l'oxalate. Cette méthode, quoique intéressante pour l'étude des variations protéiques sous l'action de divers traitements techniques du lait, présentait cependant un inconvénient majeur : celui de mélanger les constituants protéiques du lait et du lactosérum, et d'altérer les propriétés de la colonne. C'est finalement l'école australienne d'étude des protéines du lait qui a inspiré directement notre travail car les expériences déjà réalisées pouvaient servir de base à celles que nous souhaitions faire. IRONS et JONES (21) avaient défini une technique analytique à appliquer aux protéines du lait pour obtenir des fractions purifiées, mais leurs données restent trop générales. ARMSTRONG et col. (4) ont au contraire minutieusement défini la technique d'analyse et de séparation par chromatographie sur gel des protéines du lait. Leurs expériences ont été menées de façon à définir les maxima expérimentaux, en faisant varier les divers paramètres l'un après l'autre. Leur expérience précédente dans les autres procédés de détermination et de séparation des protéines du lait (électrophorèse et relargage) assure la qualité de leurs résultats expérimentaux, et c'est à leur mode opératoire que nous nous sommes rattachés. Nous avons cependant, en fonction de notre but et de nos conditions expérimentales particulières, effectué, après quelques essais, des modifications partielles pour définir un mode opératoire mieux adapté à notre problème, reproductible à température ambiante, et sans influence sur nos dosages ultérieurs.

2 - Matériels et méthodes utilisés

La colonne de chromatographie utilisée est une colonne Pharmacia Fine Chemicals, type K 25, de longueur 45 cm et contenant un volume de gel de l'ordre de 200 ml. Toutes les chromatographies réalisées ont été des chromatographies descendantes, et un applicateur d'échantillon a été utilisé.

a - Préparation de la colonne

Le Séphadex G 75 est pesé (18 g environ) et mis à gonfler pendant 24 heures dans de l'eau bidistillée. On le reprend ensuite pendant 24 heures dans le tampon HCl-imidazole pour éviter au gel de dextrane tout nouveau choc physico-chimique. Puis on coule le gel dans la colonne, placée verticalement et munie à son sommet d'un adaptateur conique. On maintient une pression de liquide (en l'occurence, le tampon d'élution) de l'ordre de 40 à 50 cm en jouant sur la hauteur du capillaire de sortie par rapport au niveau du tampon dans l'adaptateur. Il est très important que cette pression soit constante pour l'homogénéité du gel. Ainsi la colonne se tasse dans des conditions définies et auxquelles correspondent les conditions opératoires ultérieures.

A titre de vérification de l'homogénéité du gel, nous avons passé des solutions de bleu dextran sur la colonne. Les courbes d'absorption dans le bleu obtenues ont confirmé d'après les instructions de Pharmacia Fine Chemicals (VI) que le gel était apte aux séparations.

Cette colonne peut être utilisée plusieurs fois à température ambiante, à condition de ne pas la laisser sècher, de la rincer abondamment au tampon entre chaque usage et, dans notre cas particulier, de ne pas oublier d'ajouter quelques cristaux de thymol dans le lait pour éviter le développement de microorganismes mésophiles dans la colonne.

b - Préparation du tampon d'élution HCl-imidazole

Produits utilisés : - HCl 8 N, Merck 316

- Imidazole $C_3H_4N_2$, Merck 4716

Le tampon doit avoir un pH de 6,3, et une force ionique de 0,043. Pour le préparer, on pèse exactement 3,4040 g d'imidazole de poids moléculaire 68,08, et on pipette 5,37 ml d'HCl 8 N. Les deux composants sont dissous ou dilués dans de l'eau bidistillée. On amène la dilution à un litre en prenant soin de vérifier que la température du liquide à l'intérieur de la fiole est égale à 20°C. Il est recommandé de conserver ce tampon au froid, mais il faut le ramener à température ambiante avant utilisation.

c - Utilisation du spectrophotomètre d'absorption atomique

Le zéro doit être réalisé sur l'eau bidistillée, et la concentration en cuivre de l'éluat vérifiée à chaque dosage. Pour tous les dosages que nous avons effectués sur les éluats de chromatographie, le passage dans l'appareil a été direct. Il y avait des inconvénients dus à une variation de viscosité de l'éluat, diminuant ou modifiant le flux vaporisé. Mais en fait, nous avons négligé ce facteur, comme nous le permettait l'étude présentée par PINTA (VII). Nous avons vérifié sur une gamme d'étalonnage réalisée dans le mélange HCl-imidazole que les étalonnages déjà réalisés s'appliquaient. Il convient toutefois d'enlever à la valeur de l'absorption 0,001, correspondant à l'absorption propre du tampon, pour se ramener aux conditions d'étalonnage définies par le tableau suivant :

Concentration en ppm du cuivre dans les solutions d'étalonnages	Lecture sur le galvanomètre
0,1	0,001
0,2	0,002
0,5	0,006
1,0	0,013
2,0	0,026
5,0	0,069
10,0	0,136

Pour les autres dosages du cuivre par spectrophotométrie d'absorption atomique, qui font intervenir diverses techniques préalables de minéralisation, ce sont les étalonnages correspondant à ces techniques, et que nous avons déjà définis, qui ont été considérés.

3 - Description des expériences - Résultats obtenus

Série 1 : lait du 26 avril 1971

La technique décrite ci-dessous s'applique au lait écrèmé de la façon dont il a été défini auparavant, et reprend celle décrite par ARMSTRONG, Mc KENZIE et SAWYER (6) et par ARMSTRONG, Mc KENZIE et MURPHY (7).

Une aliquote de lait entier est traitée par du $(NH_4)_2SO_4$ en cristaux à température ambiante. On procède dans un bécher de 600 ml, sur 200 ml de lait dont l'agitation est maintenue rapide et constante à l'aide d'un gros agitateur magnétique. Les cristaux de $(NH_4)_2SO_4$ (et en l'occurence 52,8 g pour 200 ml, soit 264 g pour 1 litre) sont dissous peu à peu dans le lait. L'agitation violente dure 45 minutes. Le milieu est ensuite agité encore pendant deux heures à une vitesse modérée. Puis le bécher est laissé au repos à la température du laboratoire, pendant toute la nuit. Le lendemain on centrifuge pendant 10 minutes à 3 000 g en pots de 100 ml.

Trois fractions apparaissent à la centrifugation : en surface, les corps gras et au culot, la caséine et les protéines insolubles, ces deux fractions étant séparées par le petit lait (lactosérum) contenant les protéines solubles.

Une aliquote de lactosérum est alors délicatement pipetée (15 ml) et placée au sommet de la colonne de Séphadex G 75. L'élution est immédiatement entreprise à l'aide du tampon HCl-imidazole pH 6,3. Des fractions d'élution de 5 ml sont ensuite récoltées à l'aide d'un collecteur Gallenkamp et de tubes de 50 ml. Le système de mesure des 5 ml à l'aide d'un siphon jaugé s'avère peu commode à cause du pouvoir moussant des solutions protéiques à ces concentrations et a pu amener de petites erreurs dans la mesure des volumes.

Les fractions d'éluat, immédiatement après la fin de l'élution, sont passées au Spectrophotomètre ZEISS PMQ 2 de façon à évaluer leur absorption à 280 mμ.

Cette absorption est mesurée pour une largeur de 1 cm des éluats et dans des cuves en quartz. Le 100 % de transmission est réalisé sur l'eau bidistillée. L'absorption propre de l'éluat (tampon imidazole-HCl pH = 6,3-) est retranchée des chiffres d'absorption propre de chaque fraction. On peut ainsi, à l'aide des résultats obtenus, dresser la courbe d'absorption des diverses fractions d'élution en fonction du volume d'élution.

Une fois l'élution terminée, les diverses fractions sont conservées au froid et dès que possible dosées quant à leur contenu en cuivre par la méthode de spectrophotométrie d'absorption atomique, comme nous l'avons déjà défini.

Les résultats obtenus permettent de dresser les courbes et les tableaux que nous avons rassemblés dans le paragraphe suivant et qui présentent sous une forme plus parlante la majeure partie de notre travail.

Série II : lait du 10 mai 1971

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons essayé de modifier légèrement le mode opératoire précédent pour obtenir peut-êtrede meilleurs résultats.

Le pH initial du lait était égal à 6,5. Dès son arrivée au laboratoire, dans des conditions déjà précisées, le lait a été écrémé à la centrifugeuse Jouan pendant 10 minutes à 3000 g. Nous avons ensuite réalisé sur le lait écrémé, les mêmes opérations que dans les expériences de la série 1. 52,8 g de $(NH_4)_2SO_4$ sous forme de cristaux ont été lentement versés dans 200 ml de lait écrémé sous forte agitation magnétique. On a ajouté aussi un cristal de thymol pour éviter le développement ultérieur éventuel de microorganismes. L'agitation rapide a été poursuivie pendant 45 mn, puis une agitation plus lente réalisée pendant 2 heures. L'ensemble est laissé au repos pendant toute la nuit à la température ambiante.

Une nouvelle centrifugation à 3000 g pendant 10 minutes permet de séparer les protéines insolubles des protéines solubles du petit lait. Le pH du petit lait est alors égal à 6,8.

Une aliquote de lactosérum de 11 ml est alors prélevée et placée au sommet de la colonne de gel. L'élution est réalisée de la même façon avec le tampon imidazole HCl de pH 6,3. Les fractions de 5 ml sont recueillies at analysées au spectrophotomètre à 280 mμ. Ces fractions sont ensuite reprises pour permettre la détermination du cuivre par spectrophotométrie d'absorption atomique. Cette série se caractérise aussi par le fait que l'élution a été prolongée, de façon à permettre une élution totale non seulement des protéines, mais encore des diverses molécules du lait de poids moléculaire moins élevé.

Nous avons réalisé aussi dans ce cas là des déterminations de l'élément calcium sur les diverses fractions du lait : lait entier, crème de première centrifugation, caséinate après précipitation, lactosérum. Ces résultats ont été obtenus par la méthode d'absorption atomique. Nous avons été amenés, de façon à mieux définir nos conditions opératoires de filtration sur gel, à doser les protéines totales du petit lait. Nous avons utilisé la méthode de Lowry.

Réactifs utilisés

- Une solution cuproalcaline, dont la réaction est basée sur le principe du biuret, et le réactif de Folin. Le réactif cuproalcalin est réalisé en mélangeant 45 ml d'une solution alcaline (contenant 84 g de CO_3HNa et 45 g de pastilles de NaOH par litre) à 5 ml d'une solution cuprique (contenant 1 g de $CuSO_4$, 5 H_2O et de 2 g de tartrate double de Na et de K par litre).

- Réactif de Folin dilué au demi.

La méthode est étalonnée à l'aide de solutions de sérum albumine à 0,1 g/l, préparée par dilution de poudre purifiée dans H_2O distillée.

Mode opératoire

La manipulation s'effectue dans une série de tubes à essai suivant le schéma suivant :

n° du tube	0	1	2	3	4	5	Essai 1	Essai 2
Sérum albumine à 0,1 g/l	0 ml	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	1 ml	5 ml
H_2O distillée	5 ml	4 ml	3 ml	2 ml	1 ml	0 ml	4 ml	0 ml
Réactif cupro-alcalin	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Mélanger et attendre 10 minutes

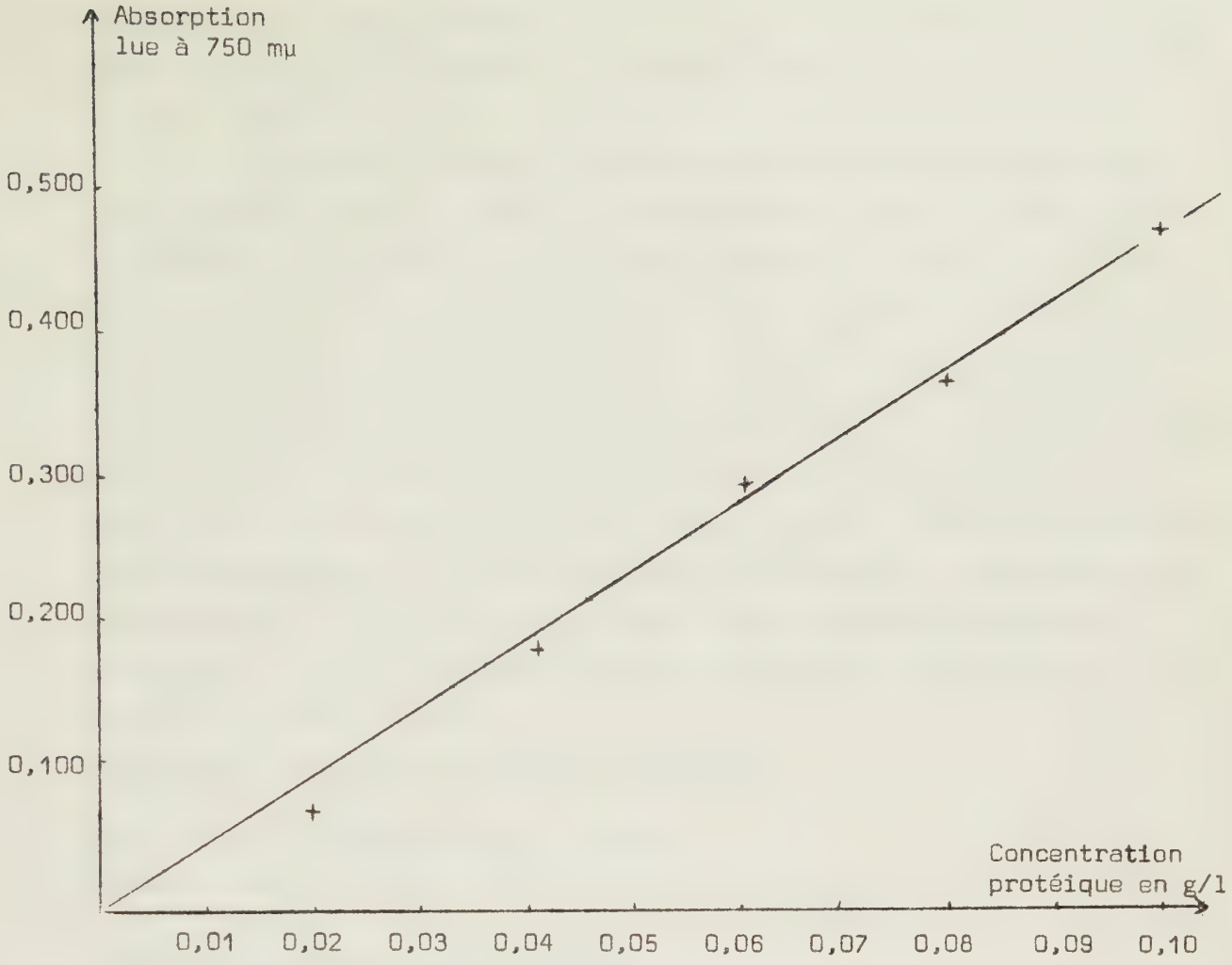
Réactif de Folin dilué au 1/2	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

Mélanger et attendre 30 minutes

La coloration obtenue est ensuite lue au Spectrophotomètre ZEISS sur environ 4 ml de solution, dans une cuve en verre de largeur 1 mm, à 750 mμ et pour une ouverture de fente de 0,1 mm.

Le zéro d'absorption est réalisé sur le tube n° 0 qui est le "blanc" de la gamme.

Les résultats obtenus permettent de tracer la droite d'étalonnage donnant la concentration protéique de l'essai en fonction de son absorption à 750 mμ dont la représentation est située ci-après.



Dosage des protéines - Méthode de Lowry

Série III : lait du 3 juin 1971

Là encore, il s'agit d'une série d'expériences de mise au point destinées à améliorer nos conditions opératoires et à compléter nos résultats analytiques.

Le lait à son prélèvement présentait un pH de 6,5 - 6,6. 400 ml furent centrifugés et la crème obtenue futpesée. Cette fois, nous avons décidé d'essayer l'action du $(NH_4)_2SO_4$ en solution. Nous avons considéré la quantité habituellement utilisée de $(NH_4)_2SO_4$, soit 52,8 g pour 100 ml d'eau. Nous nous sommes aperçus qu'à température ambiante cette solution est saturée. Mais ce $(NH_4)_2SO_4$ apportant un facteur de dilution important au petit lait, nous avons réalisé la technique suivante;

A température ambiante, 52,8 g de $(NH_4)_2SO_4$ ont été dissous dans 100 ml d'eau bidistillée, ce qui donne une solution 4 M. 40 ml de cette solution sont alors ajoutés lentement et sous agitation, à l'aide d'une burette, à 100 ml de lait écrèmé, ce qui a pour effet de précipiter les protéines. Une agitation lente de 1 heure 30 minutes est réalisée, et

l'ensemble est laissé pendant la nuit au repos à la température du laboratoire. La suite des opérations est réalisée comme précédemment sur 15 ml de petit lait.

Toutefois un certain nombre de déterminations complémentaires sont réalisées. Ainsi on calcule le pourcentage de crème au litre, celui du caséinate d'ammonium, et on dose par la méthode de Lowry les protéines dans le lait écrémé et dans le lactosérum. Des aliquotes des diverses fractions du lait entier, du lait écrémé, de la crème et du lactosérum sont prélevées en vue de doser le cuivre et le calcium après minéralisation. Autre chose importante, nous nous sommes posés la question de définir la meilleure technique de dosage des protéines solubles dans nos éluats. A cet effet, nous avons comparé les résultats obtenus par la méthode d'absorption spectrophotométrique, et les deux méthodes de dosage que nous sommes habitués à utiliser ; celle de Lowry et celle plus précise du Biuret. Une discussion à ce propos apparaîtra dans nos résultats, les dernières techniques étant données ci-après.

Dosage des protéines par la méthode du Biuret.

Etalon : sérumalbumine bovine à 5 mg/ml

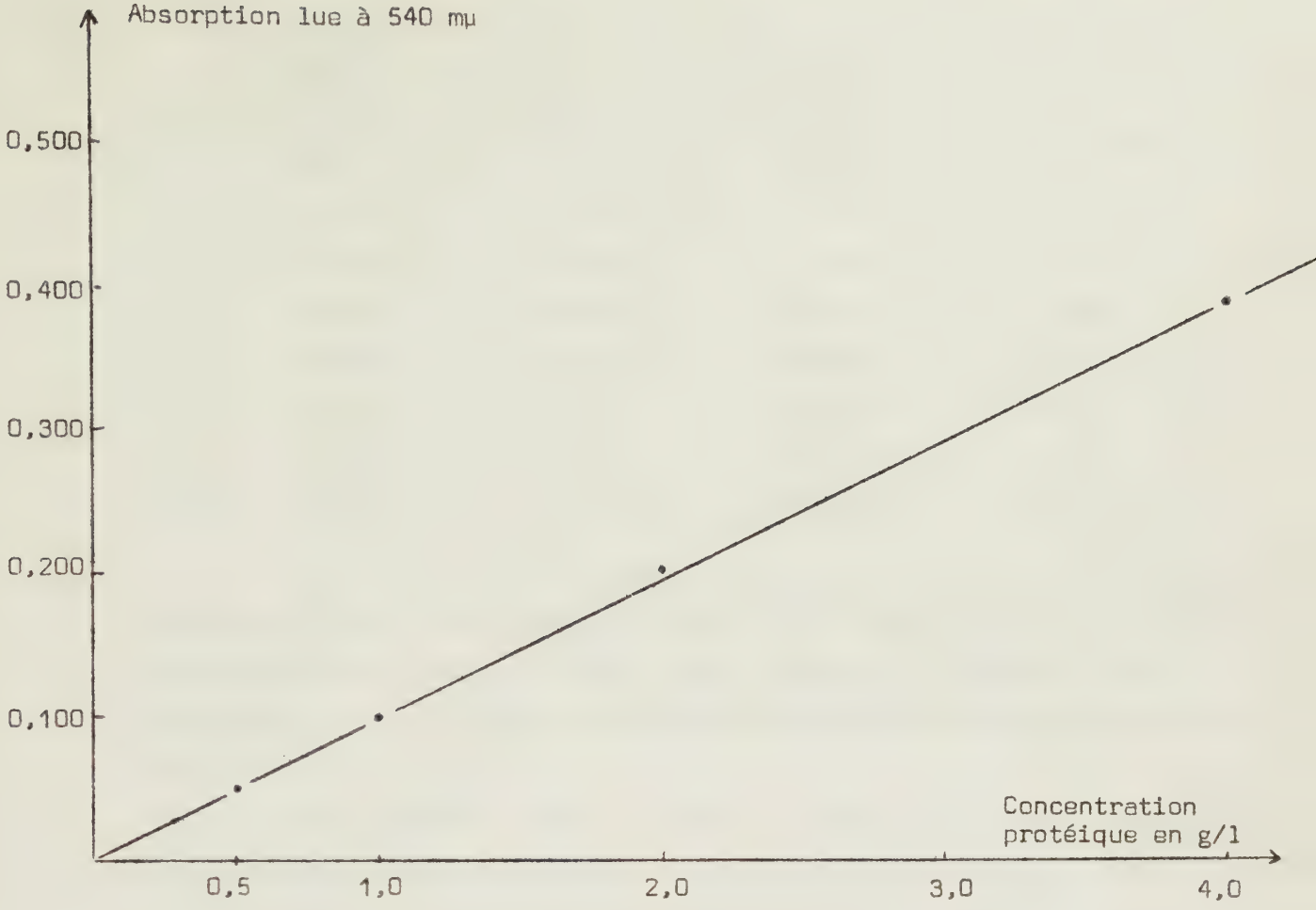
Gamme : 0,1 ml 0,2 ml 0,4 ml 0,6 ml 0,8 ml
0,5 mg 1 mg 2 mg 3 mg 4 mg

Réactifs : cholate de sodium à 4 %
soude à 10 %
$CuSO_4$ à 1 %

Essai : 0,1 ml + 0,2 ml de cholate. Attendre 2 minutes en agitant
Soude q.s.p. 2,7 ml. Agiter. $CuSO_4$: 0,3 ml. Agiter. Attendre 12 mn
Lire au spectrophotomètre à 540 mμ dans l'ordre d'addition de $CuSO_4$.

Produit à doser	-	-	-	-	-	-	0,1 ml
Albumine étalon	0 ml	0,1 ml	0,2 ml	0,4 ml	0,6 ml	0,8 ml	-
Cholate	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
NaOH	2,5 ml	2,4 ml	2,3 ml	2,1 ml	1,9 ml	1,7 ml	2,4 ml
$CuSO_4$	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml

La coloration obtenue est stable entre 12 et 15 minutes après l'addition de $CuSO_4$. L'étalonnage donne la courbe ci-après.



Dosage des protéines - Méthode du Biuret.

Détermination relative de la concentration protéique du lactosérum en fonction de son absorption à 280 mμ

Un lactosérum de lait (petit lait) a été considéré comme témoin et dosé par les méthodes habituelles quant à sa concentration protéique ; celle-ci a été trouvée égale à 4,0 g par litre.

L'absorption de cette solution à 280 mμ était trop forte pour être mesurée sur l'échelle du galvanomètre. Mais cette absorption étant proportionnelle à la concentration protéique, nous avons pensé à diluer le lactosérum dans le tampon HCl-imidazole pour en quelque sorte déterminer la concentration protéique de nos éluats.

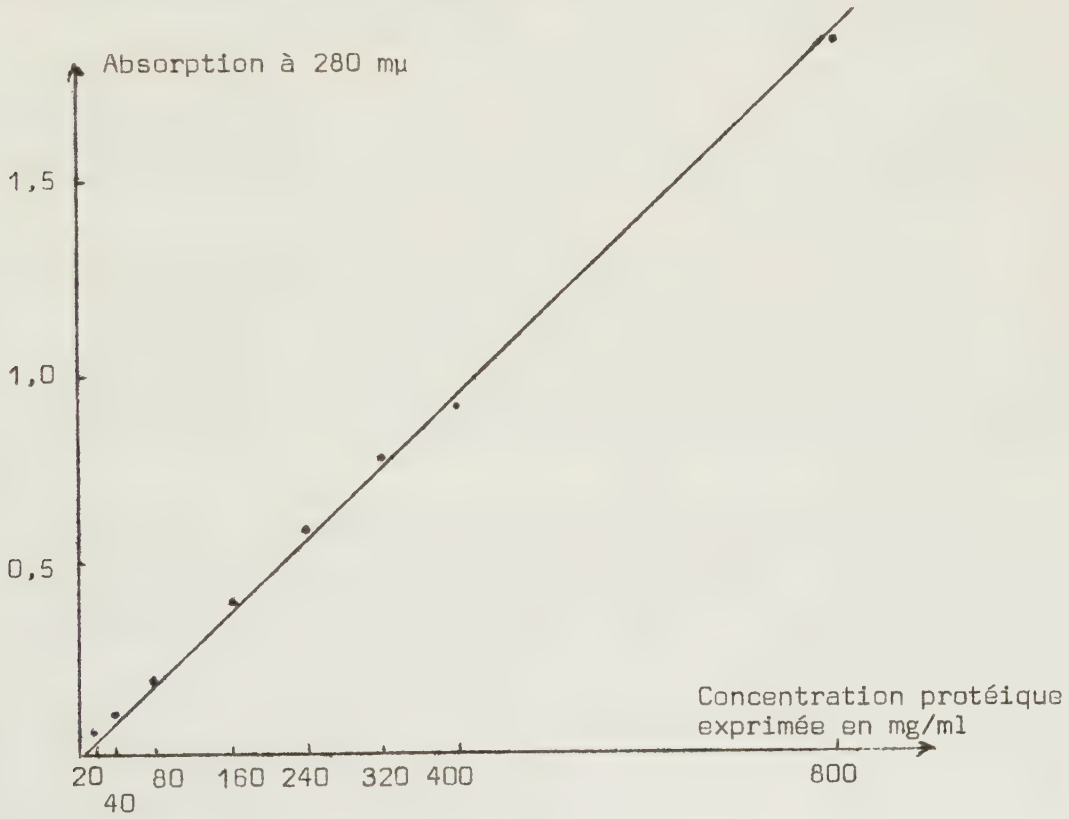
Les mesures ont pu être réalisées dans une gamme étendue de concentrations allant de l'ordre de 20 mg/litre à 400 mg/litre.

Voici le tableau des absorptions mesurées à 280 mμ, cuve quartz, sur le spectrophotomètre ZEISS PM_4Q_3, fente 0,1 mm.

Solution initiale 4 g/litre	Tampon HCl-imidazole	Concentration protéique approximative	Absorption mesurée
0,05 ml	9,95 ml	20 mg	0,050
0,10 ml	9,90 ml	40 ml	0,103
0,20 ml	9,80 ml	80 mg	0,203
0,40 ml	9,60 ml	160 mg	0,395
0,60 ml	9,40 ml	240 mg	0,592
0,80 ml	9,20 ml	320 mg	0,774
1,00 ml	9,00 ml	400 mg	0,948
2,00 ml	8,00 ml	800 mg	1,92

Nous pouvons aussi tracer la courbe ci-dessous, dont l'excellente linéarité permet un bon étalonnage relatif de l'échelle du galvanomètre en concentrations protéiques. Ce fait est d'autant plus intéressant que la concentration de nos éluats se situe parfaitement dans les limites de l'étalonnage.

Cette méthode, quoique relative et liée à un protocole expérimental particulier, donne immédiatement et sans aucune expérience supplémentaire l'ordre de grandeur de la concentration protéique des éluats.



Absorption à 280 mμ des protéines du lactosérum

Série IV : lait du 22 novembre 1971

Pour des raisons bien compréhensibles, nos expériences ont dû être interrompues. A la rentrée suivante, la vache qui nous fournissait du lait avait disparu. Nous nous rabattîmes donc sur un autre animal de la même espèce et qui venait de vêler, ce qui nous permit de continuer nos expérimentations dans des conditions sinon identiques, du moins similaires.

Le lait est prélevé et conservé dans les conditions précédemment décrites, puis il est, après passage au pH-mètre, centrifugé pendant 10 minutes à 3000 g. On pèse alors la quantité de corps gras obtenue. 22,9 g de lait écrémé sont ensuite traités par 40 ml d'une solution de $(NH_4)_2SO_4$ saturée à 20°C, préparée à froid, présentant un excès de cristaux, et dont le pH a été au préalable mesuré. On agite doucement pendant environ 1 heure, puis on laisse reposer pendant la nuit. L'ensemble est repris par une centrifugation de 10 minutes à 3000 g le lendemain matin. On reprend le pH du petit lait surnageant, et des aliquotes de lait, de petit lait et de crème sont réalisées pour la minéralisation dans des conditions déjà décrites. 15 ml de lactosérum sont repris et placés en haut de la colonne d'élution. L'élution est réalisée avec le tampon imidazole, et les diverses fractions passées au spectrophotomètre d'absorption à 280 mμ, puis en absorption atomique pour doser le cuivre.

La seule méthode de dosage conservée pour les protéines a été le passage au spectrophotomètre à 280 mμ.

Les résultats de cette série nous ont encouragé dans cette voie, et nous avons essayé de perfectionner encore nos expérimentations.

Série V : lait du 2 décembre 1971

Nous avons voulu standardiser le procédé de précipitation de la caséine et des protéines insolubles, de façon à pouvoir comparer nos résultats par l'utilisation de conditions expérimentales identiques et reproductibles.

Donc, nous avons été amenés à préparer du $(NH_4)_2SO_4$ parfaitement saturé à température ambiante. A cet effet, nous avons utilisé de l'eau bidistillée bouillante que nous avons saturée avec du $(NH_4)_2SO_4$ en excès. Ainsi à froid, quelle que soit la température, cette solution présente les caractéristiques d'une solution parfaitement saturée avec excès de cristaux. Par action de l'ammoniaque, la solution a été ramenée à pH 7, et c'est cette solution saturée que nous utilisons dorénavant pour précipiter les insolubles.

Toutes les diverses opérations sont réalisées comme précédemment, depuis la laiterie jusqu'au laboratoire, où une aliquote est passée au

pH-mètre, tandis que l'autre est centrifugée à 3000 g pendant dix minutes. On ajoute alors à 100 ml de lait écrèmé, dont le pourcentage de cuivre a été calculé, 40 ml de la solution saturée. L'agitation lente est maintenue pendant 1 H 30, puis l'ensemble repose une nuit avant d'être centrifugé à nouveau pendant 10 minutes à 3000 g. Puis 15 ml sont placés en haut de la colonne d'élution.

On minéralise des aliquotes de corps gras, de petit lait et de lait entier en vue de la détermination du cuivre par spectrophotométrie d'absorption atomique. Toutes les opérations suivantes d'élution, de dosage spectrophotométrique et d'absorption atomique sont réalisées de façon identique à celle déjà décrite.

Série VI : lait du 7 janvier 1972

La série d'expériences VI, bénéficiant des expériences précédentes, doit être considérée comme la plus sûre et la plus complète, et elle sert à définir la méthode d'analyse que nous avons ainsi mise au point.

Le lait, toujours prélevé et conservé de la même façon, est ensuite pesé avant la première centrifugation. Le pourcentage de crème est déterminé après 10 minutes à 3000 g, de même que le pH du lait initial. On ajoute à 100 g de lait, à l'aide d'une burette, 40 ml de la solution saturée de $(NH_4)_2SO_4$ versés lentement et sous agitation magnétique constante ainsi qu'un cristal de thymol destiné à éviter le développement des micro-organismes. Après une faible agitation de 45 minutes, on laisse reposer une nuit à la température du laboratoire. Le lendemain, on recentrifuge 10 minutes à 3000 g pour séparer le petit lait des protéines insolubles.

On minéralise des aliquotes de lait entier, de lait écrèmé, de petit lait et de graisse de façon à doser ultérieurement le cuivre par la méthode d'absorption atomique.

Fait nouveau, 25 ml de petit lait après centrifugation sont mélangés à 25 ml d'une solution de cuivre à 20 ppm. Celà donne un nouveau petit lait supplémenté.

Chacun des deux petits laits, celui obtenu normalement et celui supplémenté, sont traités de la même façon par filtration sur gel(l'un après l'autre tout de même) de façon à définir la répartition du cuivre sur leurs protéines. Enfin, sur certaines fractions riches en cuivre et situées en fin d'élution, nous avons essayé, d'ailleurs sans succès, de mettre en évidence des acides aminés par chromatographie sur papier et révélation à la ninhydrine.

4 - Résultats

Les divers résultats que nous avons obtenus sont donnés dans leur ordre chronologique. Pour chaque série, un tableau récapitulatif donne l'allure générale de l'absorption à 280 mμ des diverses fractions d'élution, et aussi en correspondance, la teneur en cuivre de ces diverses fractions.

Entre chaque tableau se placent les résultats complémentaires que nous avons obtenus pour chaque série de déterminations.

Résultats : série I

Le pH initial du lait au laboratoire est égal à 6,55

Résultats : série II

Le pH initial du lait entier est égal à 6,55.

Produit	Elément dosé	Prise d'essai	Unités concernées
Lait entier	Calcium	10 ml	270 mg/l ou ppm
	Cuivre	10 ml	0,7 mg/ml ou ppm
Crème	Calcium	2,5 g	220 mg/kg ou ppm
	Cuivre	2,5 g	0,95 mg/kg ou ppm
Caséinate d'ammonium	Calcium	5,1 g	100 mg/kg ou ppm
	Cuivre	5,1 g	0,40 mg/kg ou ppm
Petit lait	Calcium	10 ml	100 mg/l ou ppm
	Cuivre	10 ml	inférieur à 0,05 mg/l
	Protéines (Lowry)	aliquote	7,5 g/litre
	pH (pH-mètre)	aliquote	6,8

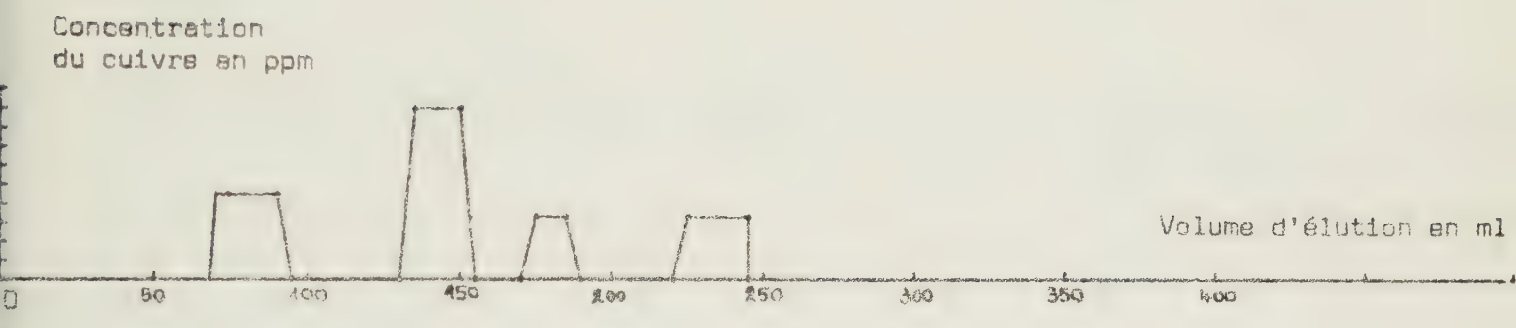
Résultats : série III

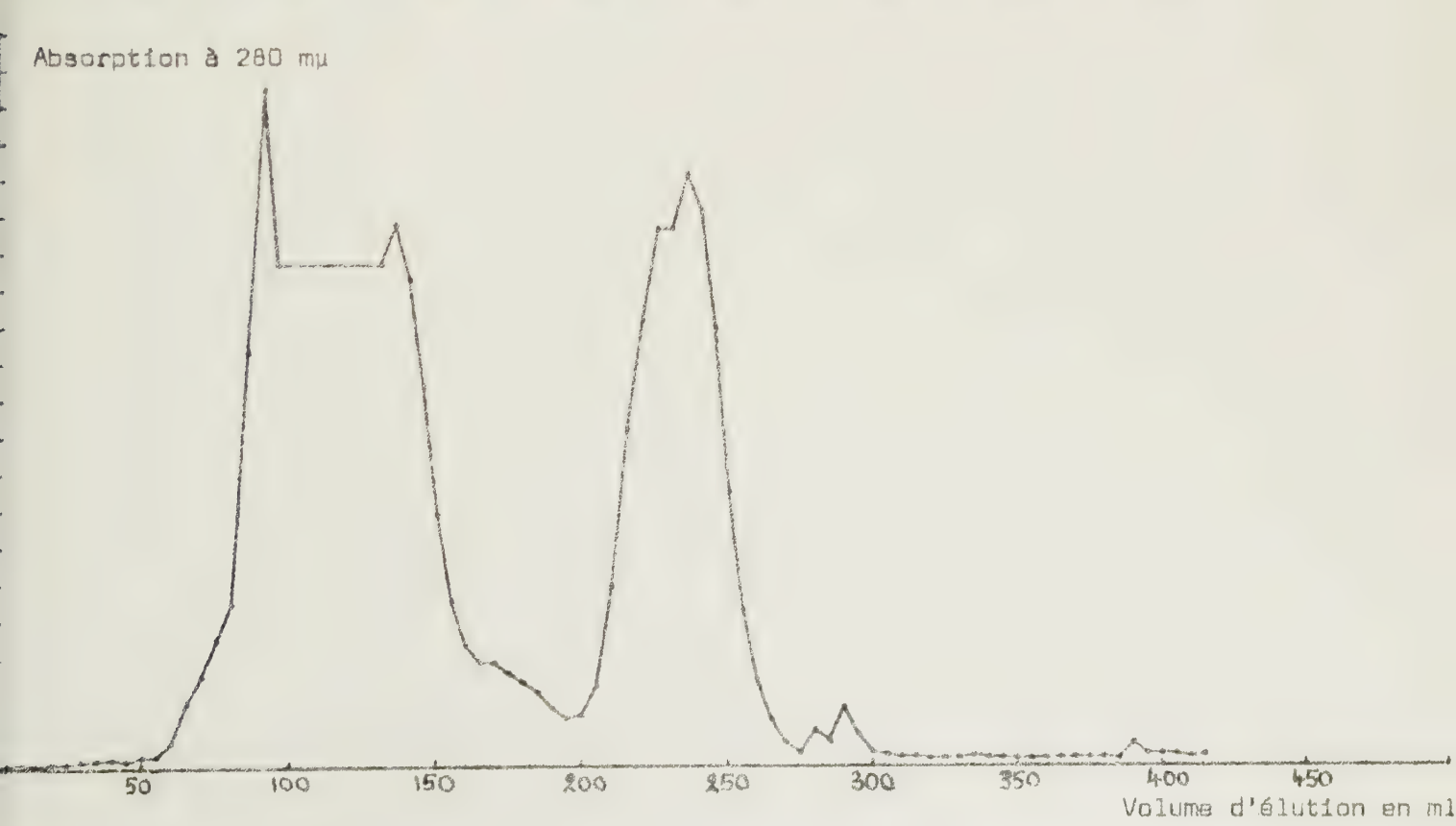
pH initial du lait entier égal à 6,55

Pourcentage de crème : 43,2 g/litre

Produit	Elément dosé	Prise d'essai	Unités concernées
Lait entier	Calcium	-	400 mg/kg ou ppm
	Cuivre	-	0,67 mg/l ou ppm
	Protéines (Biuret)	-	36,5 g/l
Lait écrêmé	Calcium	-	402 mg/kg ou ppm
Crème	Calcium	-	220 mg/kg ou ppm
Caséinate	Calcium	-	156 mg/kg ou ppm
Petit lait	Calcium	-	56 mg/l ou ppm
	Protéines (Biuret)	-	4 g/l

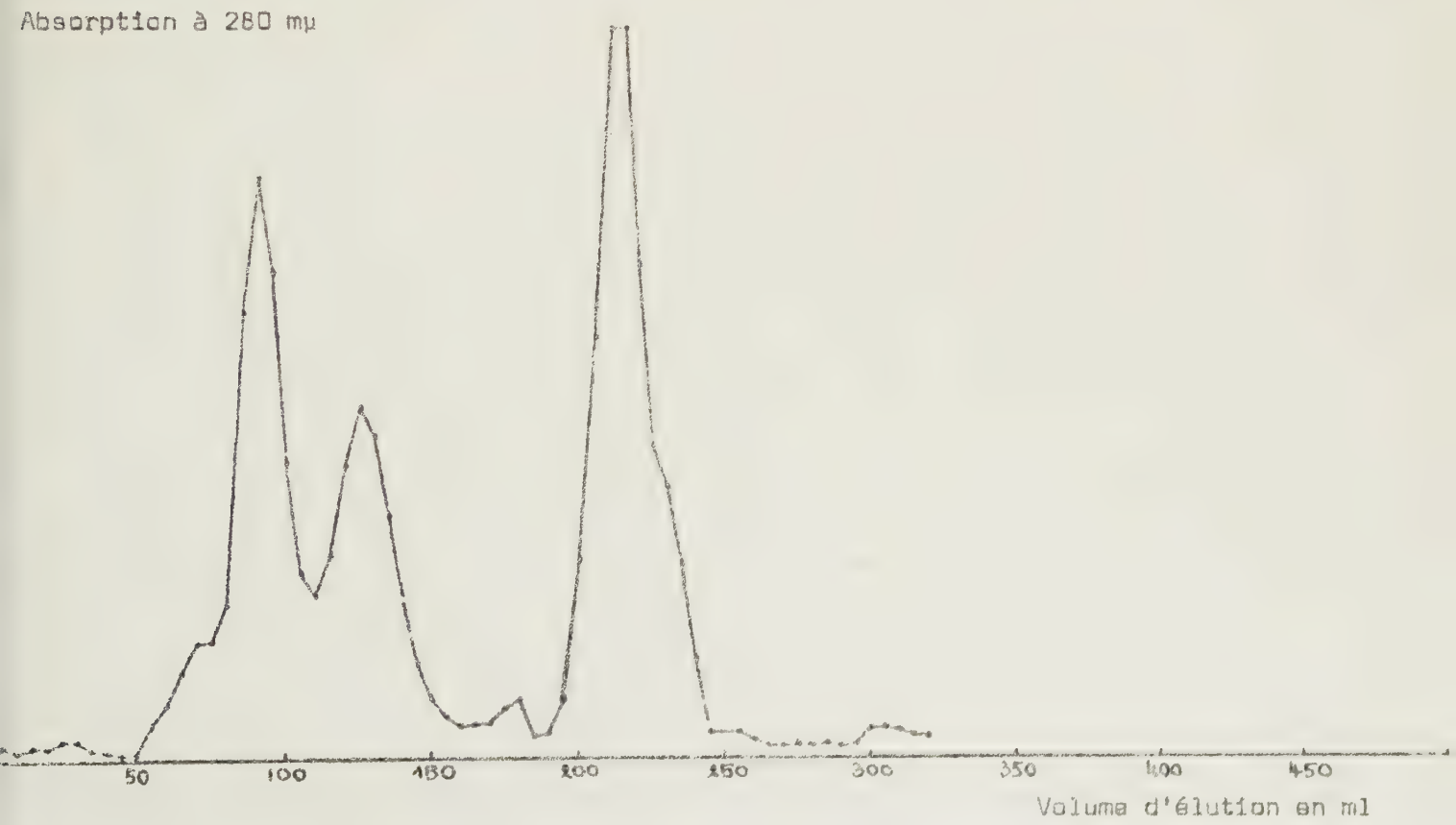
Série d'expériences n° I





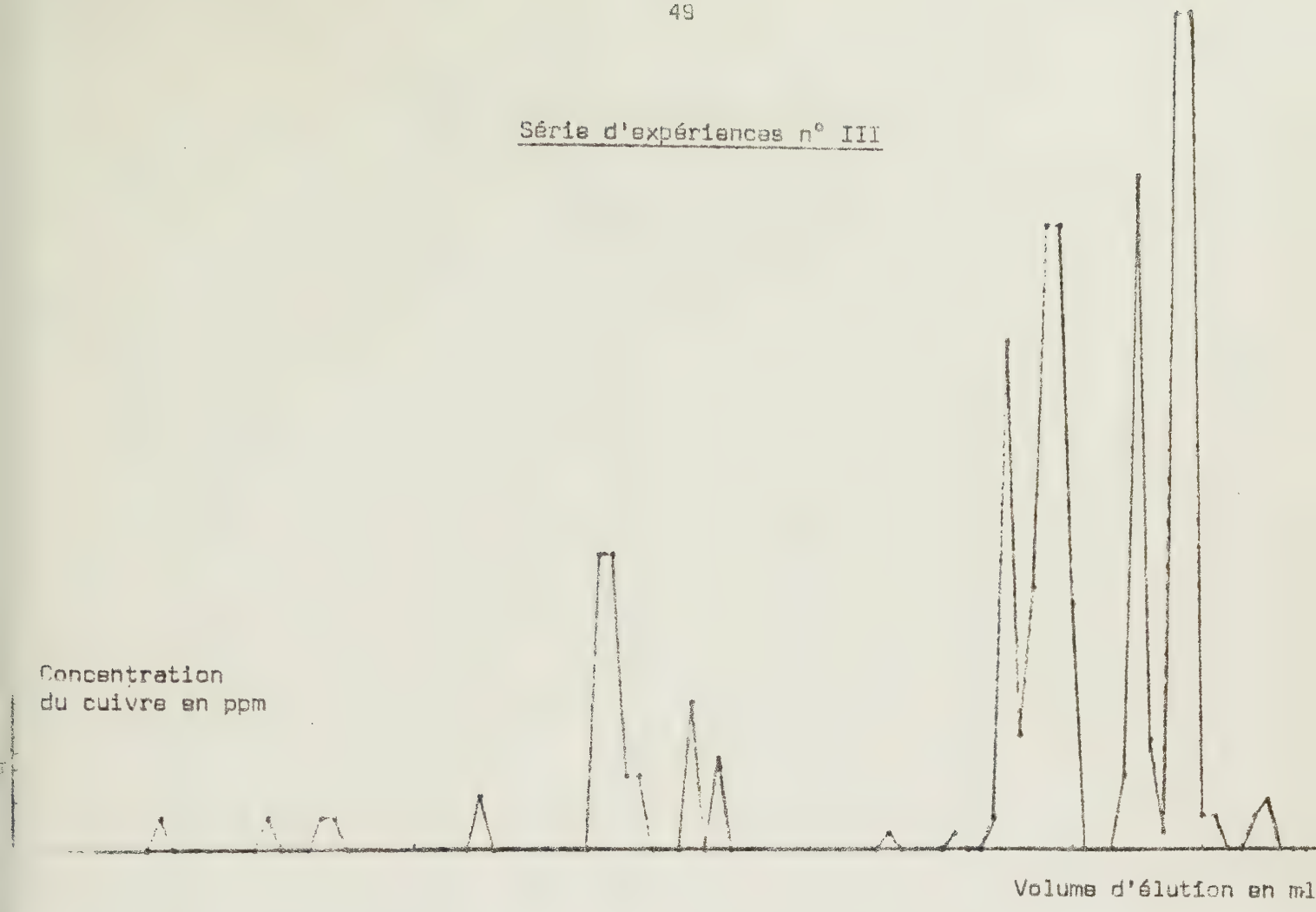
Représentation graphique des principaux résultats

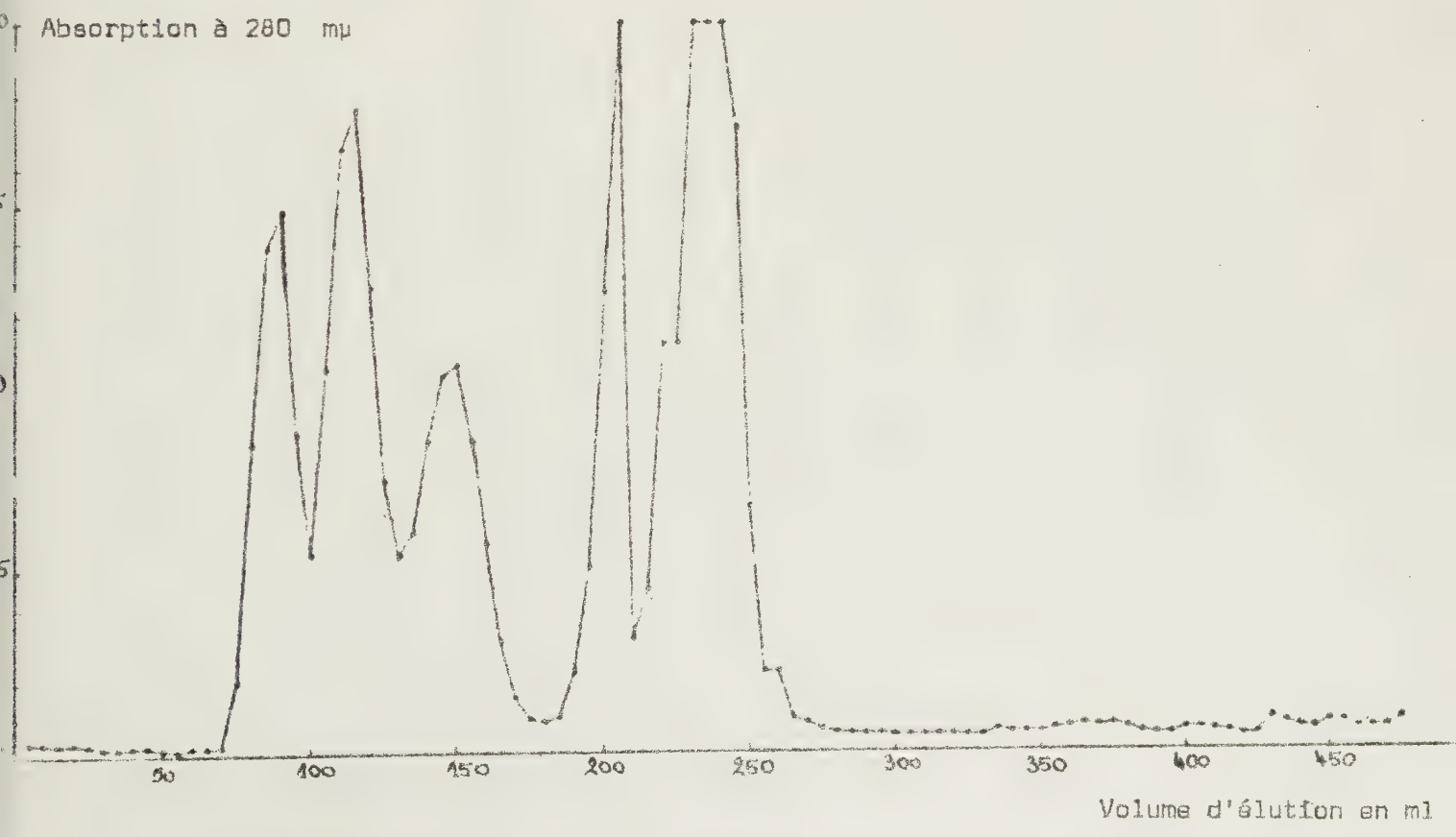
Série d'expériences n° II



Représentation graphique des principaux résultats

Série d'expériences n° III

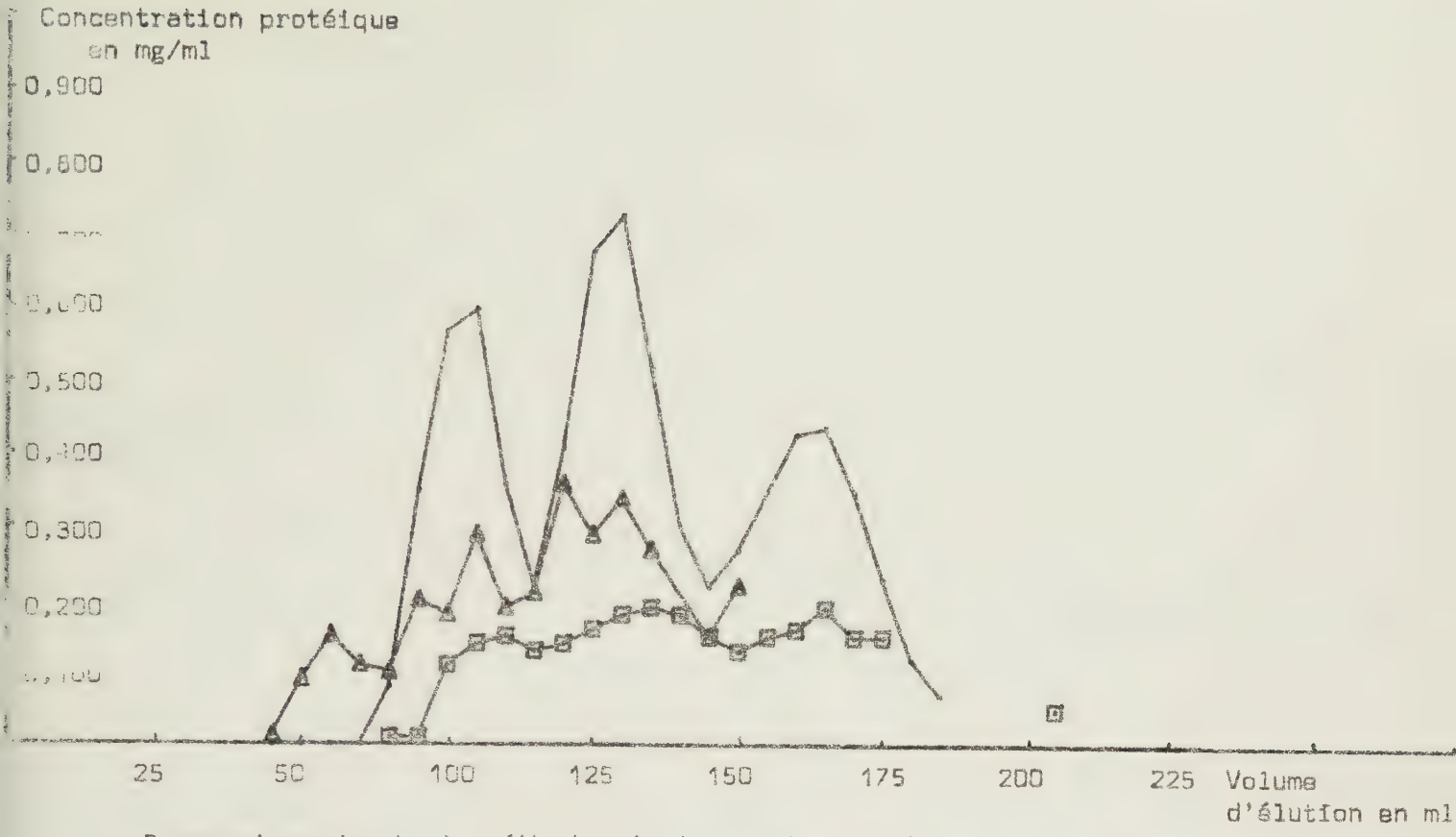




Représentation graphique des principaux résultats

Tableau de comparaison des 3 méthodes utilisées pour le dosage des protéines dans l'éluat

N° Eluat	Concentration protéique en mg/ml ou en g/l		Absorption 280 mμ
	Lowry	Biuret	
9	0,13	-	0,0
10	0,09	-	0,0
11	0,15	-	0,0
12	0,11	-	0,0
13	0,10	0,01	0,08
14	0,20	0,01	0,35
15	0,18	0,11	0,57
16	0,29	0,14	0,60
17	0,19	0,15	0,36
18	0,21	0,13	0,22
19	0,36	0,14	0,41
20	0,29	0,16	0,68
21	0,34	0,18	0,73
22	0,27	0,19	0,52
23	0,15	0,18	0,30
24	0,22	0,15	0,22
25	-	0,13	0,27
26	-	0,15	0,35
27	-	0,16	0,43
28	-	0,19	0,44
29	-	0,15	0,35
30	-	0,15	0,23
31	-	-	0,12
32	-	-	0,07
33	-	-	
36	-	0,05	



Comparaison des trois méthodes de dosage des protéines sur les éluats de chromatographie

Résultats : série n° IV

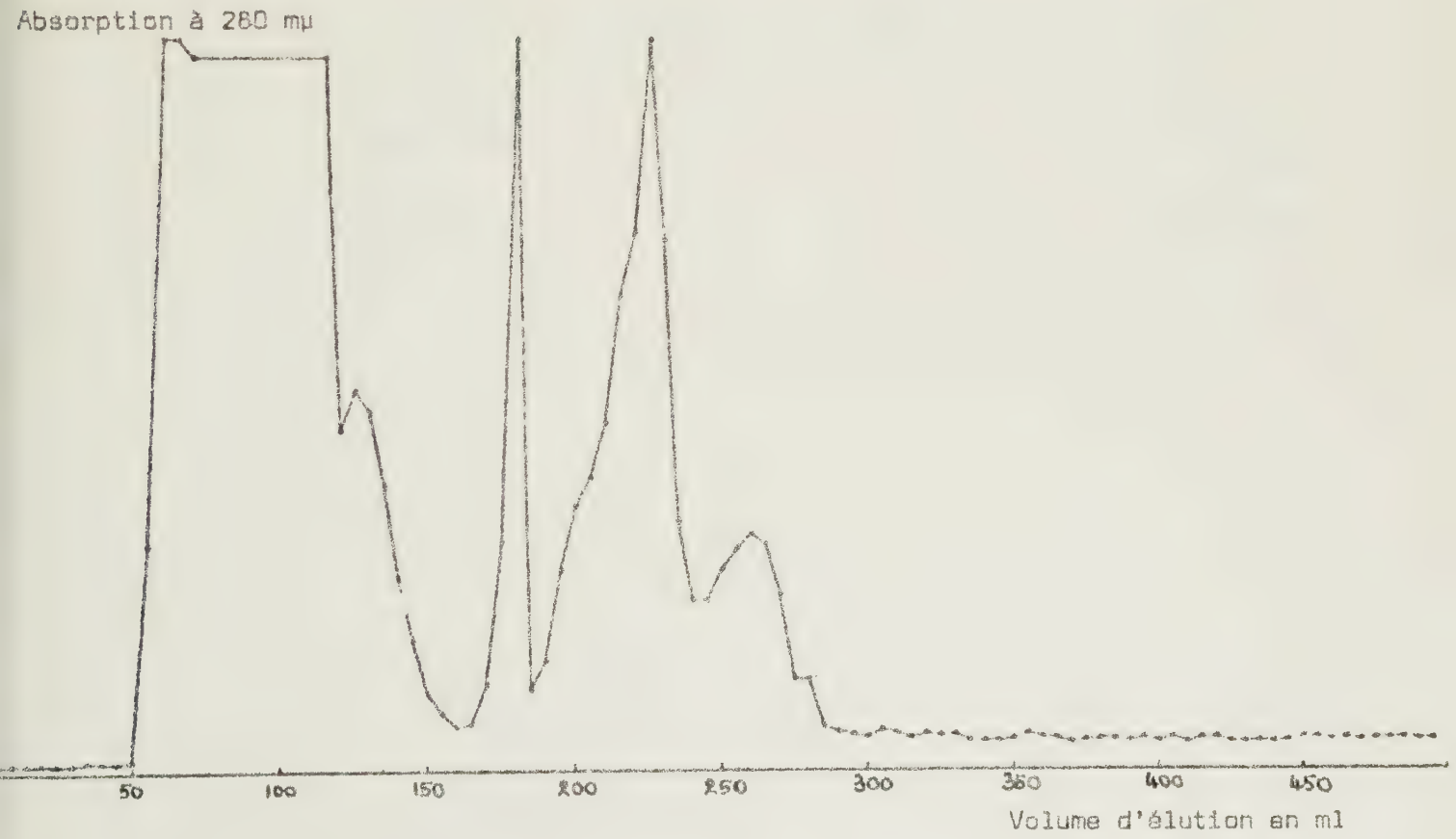
pH du lait entier initial : 6,70

Pourcentage de crème : 71 g/litre

pH du sulfate d'ammonium saturé : 5,2

Produit	Elément dosé	Prise d'essai	Unité
Lait entier	Cuivre	5 ml	0,67 mg/l ou ppm
Crème	Cuivre	0,9 g	3,2 mg/kg ou ppm
Petit lait	Cuivre	5 ml	0,2 mg/l
	pH		6,7

Série d'expériences n° IV



Représentation graphique des principaux résultats

Résultats : série n° V

pH du lait entier initial : 6,75

pH de la solution saturée (4 M) de sulfate d'ammonium : 7,0

Pourcentage de crème : 74 g/l

Produit	Elément dosé	Prise d'essai	Unité
Lait entier	Cuivre	5 ml	0,90 mg/l ou ppm
Crème	Cuivre	1,65 g	1,20 mg/kg ou ppm
Petit lait	Cuivre	5 ml	0,43 mg/l ou ppm

Résultat : série n° VI

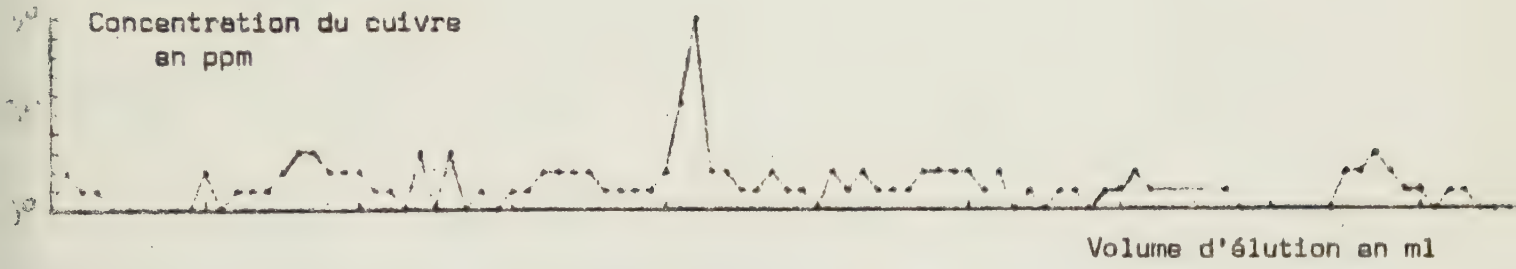
pH du lait entier initial : 6,75

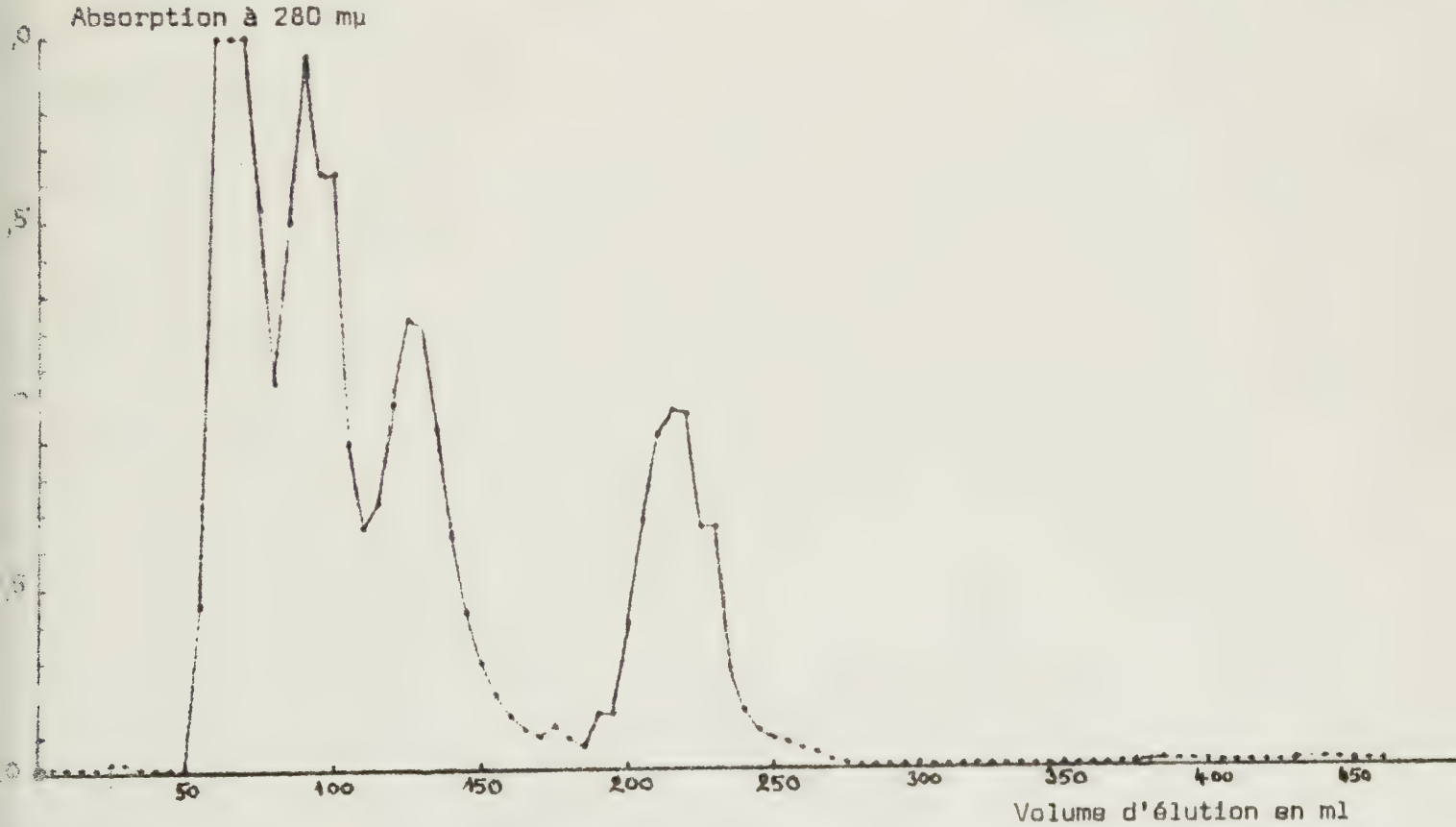
pH de la solution saturée de sulfate d'ammonium : 7,0

Pourcentage de crème : 68 g/litre

Produit	Elément dosé	Prise d'essai	Unité
Lait entier	Cuivre	5 ml	0,62 mg/l ou ppm
Lait écrèmé	Cuivre	5 ml	0,55 mg/l ou ppm
Crème Graisse	Cuivre	0,86 g	1,9 mg/kg ou ppm
Petit lait	Cuivre	5 ml	0,2 mg/l ou ppm

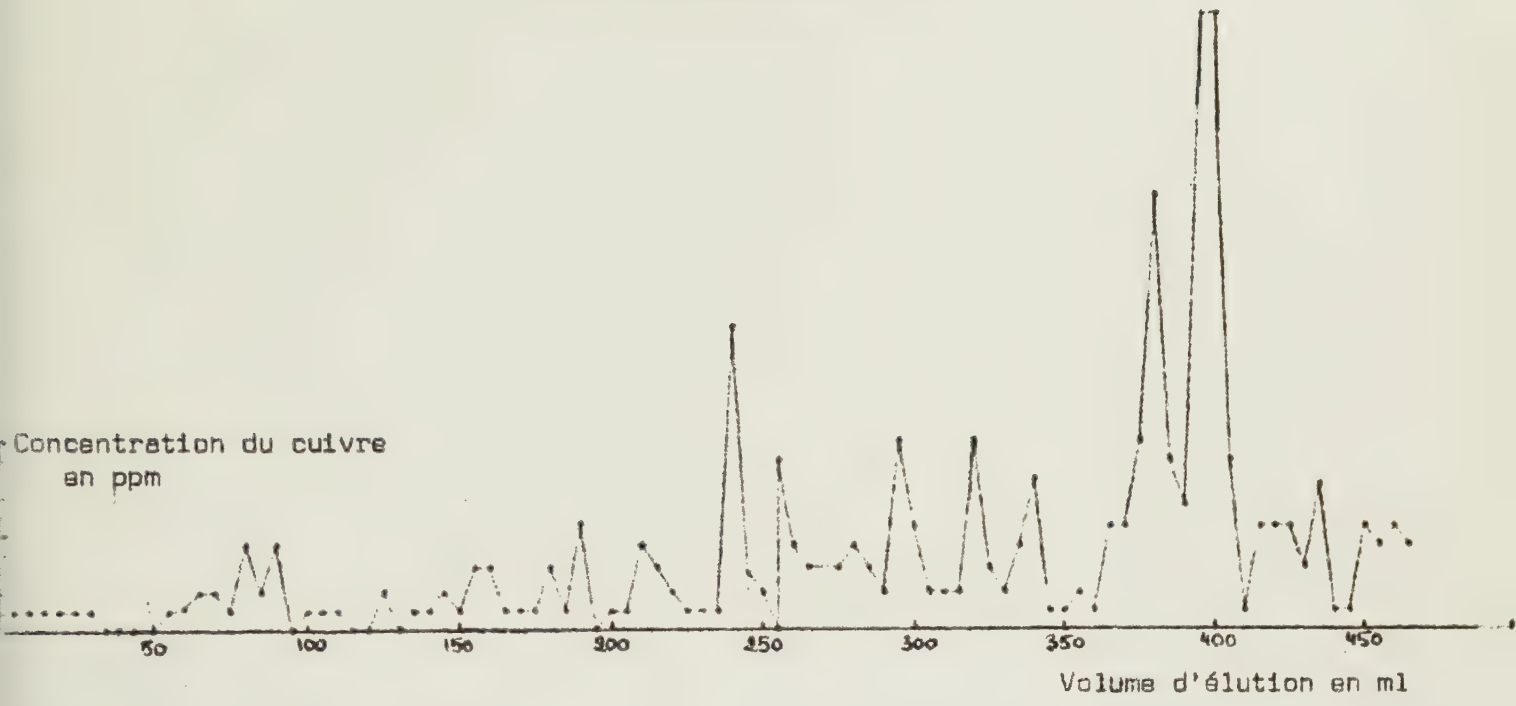
Série d'expériences n° V

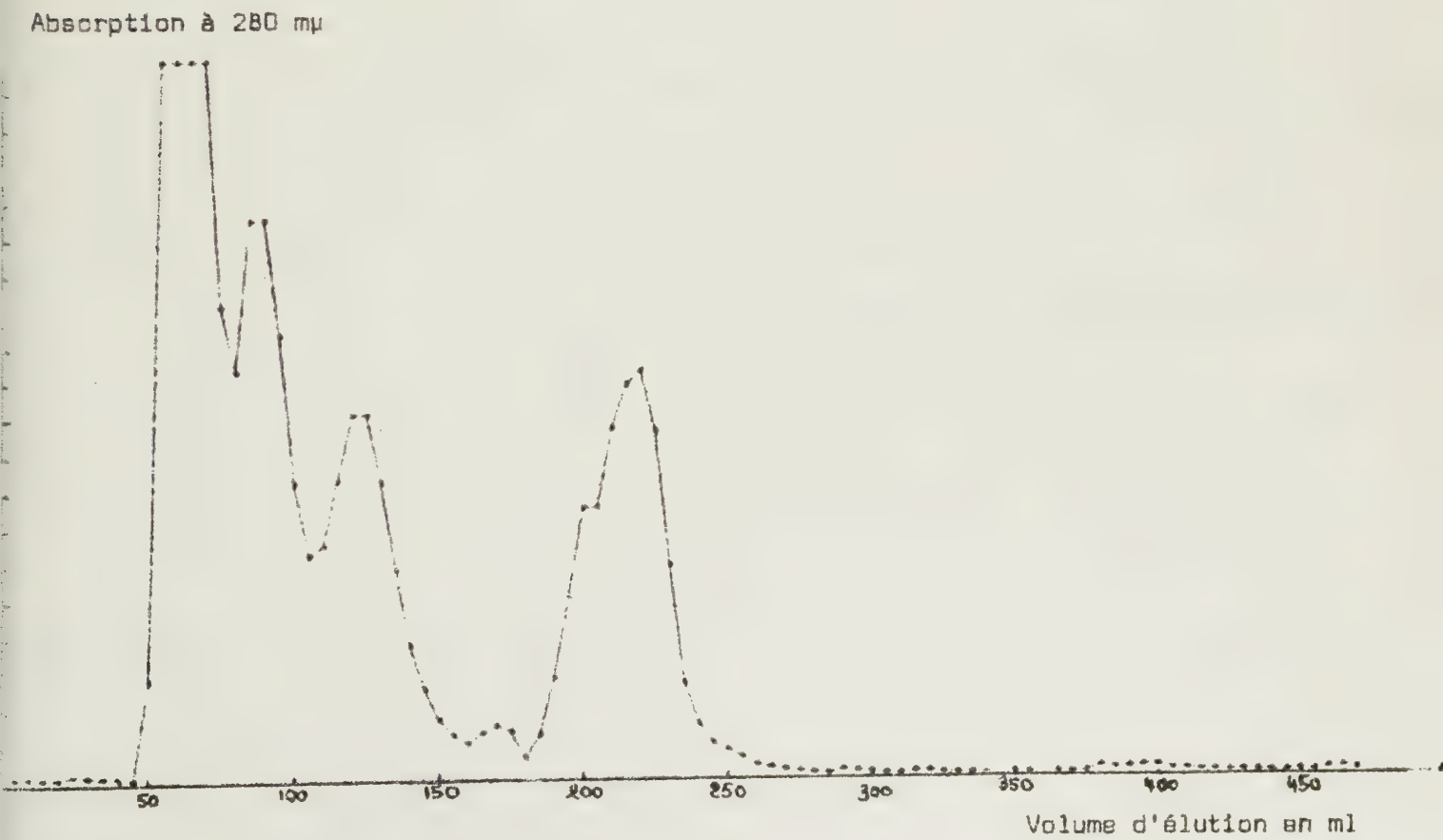




Représentation graphique des principaux résultats

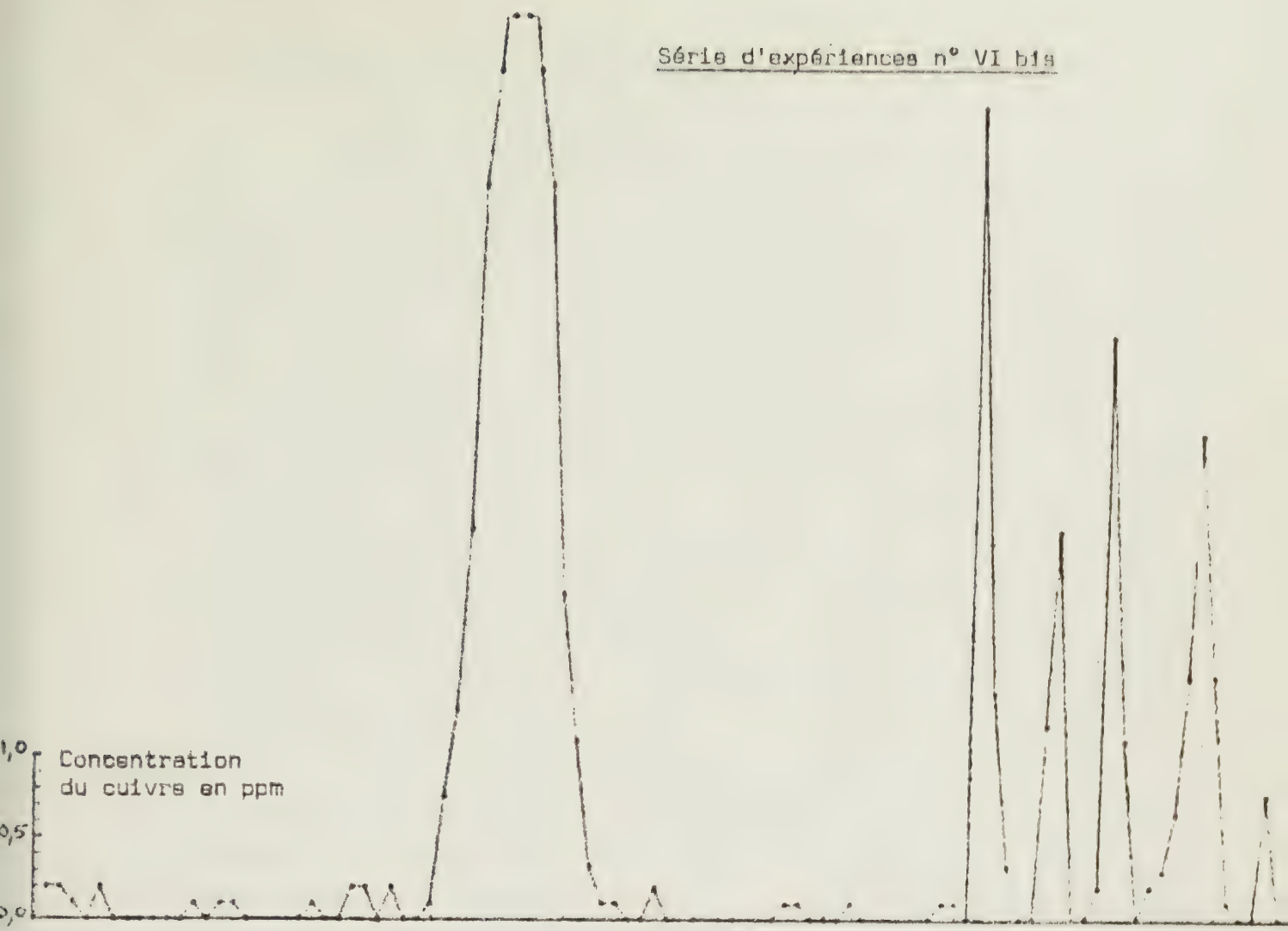
Série d'expériences n° VI

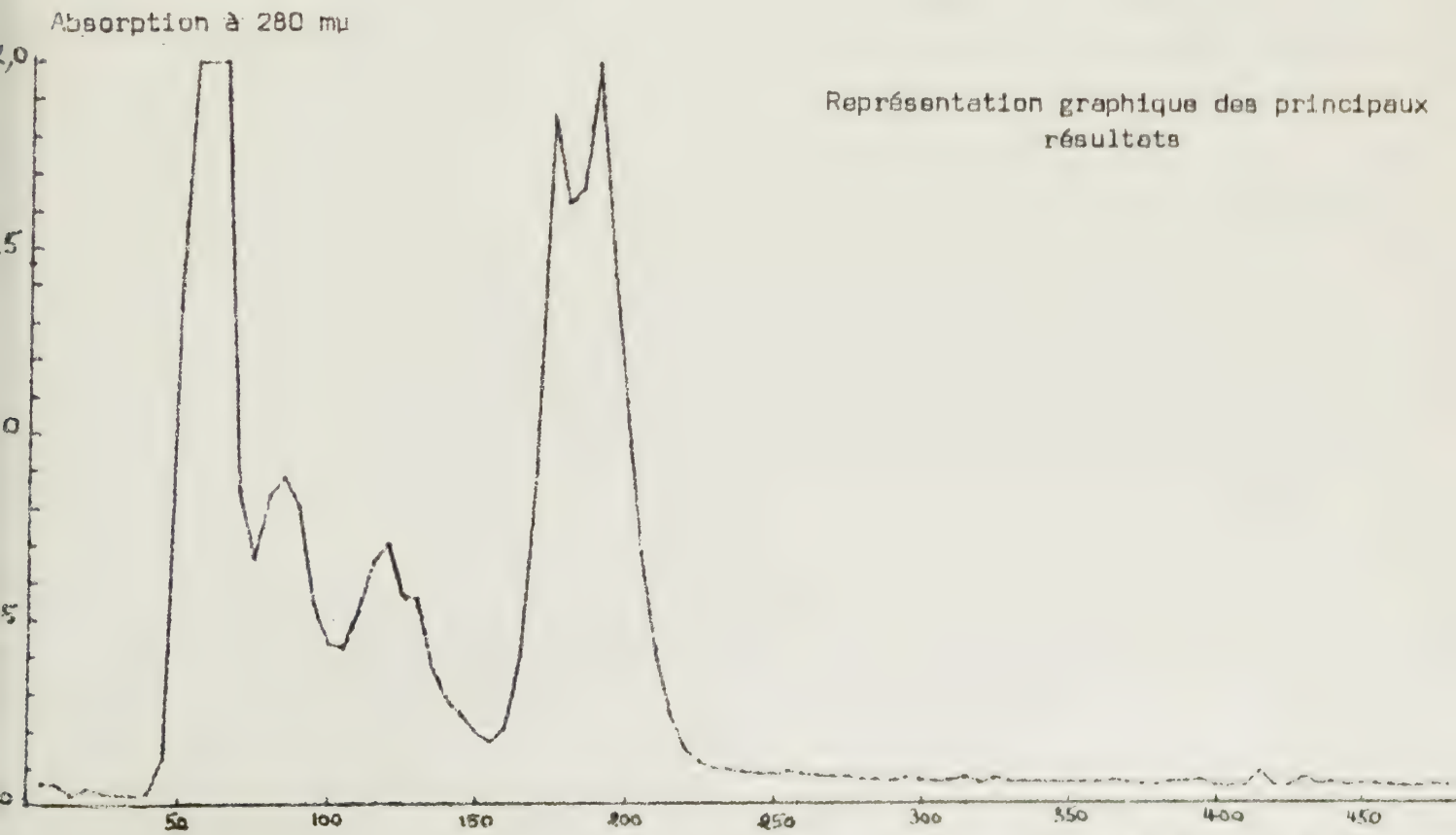




Représentation graphique des principaux résultats

Série d'expériences n° VI bis





Représentation graphique des principaux résultats

5 - Discussion sur les méthodes employées

a - Méthode de séparation des protéines

Par rapport aux travaux de ARMSTRONG (4), nos résultats paraissent plus intéressants dans la mesure où, même s'ils apportent un élément de dilution par l'emploi de sulfate d'ammonium liquide, ils permettent de mieux répartir ce sel et ainsi de séparer plus de protéines. Le nombre de pics obtenus, en effet, qui était de 5 pour ARMSTRONG est passé, dans notre série n° IV à 6, sans compter deux épaulements caractéristiques qui portent ce nombre à 8. De plus, et contrairement aux résultats précédents, la taille des pics reste toujours d'un ordre de grandeur constant, ce qui signifie que les diverses protéines obtenues se trouvent dans la fraction éluée, à des concentrations sensiblement identiques. La reproductibilité de nos mesures est assez bonne en fonction des nombreux paramètres qui peuvent influencer et modifier partiellement le mode opératoire. Ainsi, en plus de diverses expériences supplémentaires que nous avons réalisées à titre de vérification sur des lactosérums conservés au froid, les résultats des séries I et II ou V et VI, dont les conditions opératoires sont les mêmes, prouvent la bonne reproductibilité de la méthode. ARMSTRONG avait, à l'aide des méthodes classiques de détermination des protéines, (en particulier l'électrophorèse sur gel d'amidon et le calcul du coefficient de sédimentation à l'ultracentrifugation) essayé de déterminer les principaux constituants de ses pics d'élution. Si les techniques d'analyse l'assuraient de l'impureté relative de ces fractions, il est arrivé cependant à classer les divers pics en les définissant par leur constituant majeur. Bien sûr, cette technique de définition suit exactement l'ordre de masses moléculaires décroissantes, qui correspond au principe même de la chromatographie sur colonne.

Dans cet ordre, le profil d'élution obtenu par absorption à 280 mμ dénote successivement la présence de :

- lactoferrine de poids moléculaire 93 000
- sérumalbumine bovine de poids moléculaire de 69 000
- β-lactoglobuline de poids moléculaire de 36 000
- mélange de sérumalbumine, β-lactoglobuline et α-lactalbumine
- α-lactalbumine, de poids moléculaire 17 000, et constituants précédents

Ce sont les principaux constituants que nous trouvons aussi mais bien entendu dans des proportions variables, dépendant surtout du pH et du mode de précipitation par le sulfate d'ammonium.

Or la question du pH est primordiale en ce sens que le pH est le facteur principal de la solubilité des protéines.

Ainsi nous savons que, dans le cas de la β-lactoglobuline, il y a des variations de conformation aux environs de pH 7. De même, l'α-lactalbumine présente une faible solubilité dans l'échelle de pH 3,8-5,5 proche de son point isoélectrique. Il faut donc éviter ces deux extrèmes, ce qui explique l'utilisation du tampon HCl-imidazole de pH 6,3 et de force ionique I = 0,043. De plus, ce tampon reste d'un pH très voisin de celui du petit lait après action du sulfate d'ammonium et par conséquent, il semble que la rencontre entre l'éluant et le petit lait n'entraîne pas de variations sur les protéines solubles en cours d'élution.

b - Méthode de précipitation des protéines insolubles

Nous avons expérimenté là divers modes opératoires, qui consistaient d'abord à utiliser les cristaux purs, puis une solution saturée à froid, puis une solution saturée à chaud, et enfin une solution saturée à chaud ramenée à pH 7. Il paraît logique de recommander, dans le cas d'études analytiques, l'emploi de la dernière solution. En effet, malgré le facteur de dilution important qu'elle apporte, cette méthode allie une excellente reproductibilité à une souplesse de mise en expérimentation. L'utilisation d'une burette à débit variable permet de contrôler, sous faible agitation magnétique la réaction de précipitation. Le pH choisi évite les chocs physicochimiques éventuels aux protéines. En fonction des pics d'élution obtenus, nous pensons que c'est cette méthode qui permet la meilleure purification ultérieure du mélange de protéines solubles du lactosérum.

c - Emploi des cristaux de thymol

L'emploi des cristaux de thymol, préconisé par ARMSTRONG et col. (4) s'avère tout à fait nécessaire si on veut réaliser plusieurs expériences à la suite. En effet, le thymol évite le développement des microorganismes mésophiles du lait qui, sans cela, envahiraient la colonne de séphadex et la rendraient inutilisable.

d - Passage des éluats aux spectrophotomètre d'absorption atomique

Nous rencontrons là l'avantage analytique extraordinaire de la spéctrophotométrie d'absorption atomique sur les autres méthodes. En effet, même si nous sommes là très près, à 0,2 ppm, des limites de détection de l'appareil, nous avons pu définir et chaque fois en moins d'une heure, le contenu en cuivre des cent fractions de l'éluat.

Les risques que nous courions dans l'emploi de cette méthode pouvaient seulement provenir du problème de l'encrassement éventuel du vaporisateur ou de l'influence néfaste du solvant d'élution sur l'étalonnage de l'appareil. Or le solvant d'élution a aussi servi de solvant quant à la réalisation des gammes d'étalonnage de l'appareil pour l'élément cuivre. Quant au problème de la vaporisation du produit à doser, il ne s'est pas posé car le lactosérum entier peut lui-même être dosé directement, si un rinçage efficace est immédiatement effectué après son passage dans l'appareil. Le facteur de dilution des éluats est tel par rapport au lactosérum que l'on comprend aisément que ces solutions protéiques se soient toujours facilement vaporisées dans l'appareil, sans causer de problème technique. Pour doser le cuivre dans le lactosérum pur, un facteur de dilution, 5 ou 10, est toutefois à recommander pour une meilleure exploitation de la sensibilité de l'appareil. Quant aux produits minéralisés, tels que le lait, entier ou écrèmé, la crême, les fromages, etc... , BUTHIAU, ILARI, LACOME (9) et ILARI (20) ont déjà défini les précautions à prendre et les avantages de cette méthode pour le dosage du cuivre.

e - Température de travail

Il est bien évident, dans le cas de solutions de protéines, que le milieu ambiant a intérêt à être le plus près possible de la température optimale de + 4°C, de façon à éviter au maximum toute évolution de la molécule, soit dans sa structure chimique, soit même dans sa conformation. Mais l'ensemble des réactions analytiques que nous avons réalisé ne pouvait pas se dérouler en chambre froide.

De plus, deux facteurs importants nous poussaient à renoncer à une atmosphère froide : d'un côté, la longueur de nos expériences interdisait un aussi long séjour de l'expérimentateur en chambre froide ; de l'autre, les expériences éventuelles qui devaient se réaliser ultérieurement sur le lactosérum de fromagerie ne permettaient pas l'emploi d'une telle méthode. Or le principal intérêt devant être la comparaison de ces deux séries d'expériences, réalisées l'une sur du lactosérum obtenu à partir du lait dès sa sortie du pis de la vache, l'autre sur du lactosérum de fromagerie, la température de travail ambiante du laboratoire s'est imposée dès le début de nos expériences.

f - Devenir du cuivre pendant l'élution

Le cuivre pourrait avoir, sur les moles de dextrane, une action particulière susceptible d'influencer les phénomènes d'élution. On connait en effet fort bien l'affinité de l'ion Cu^{++} pour les peptides et les acides

aminés, ainsi que la définit K.D. KOPPLE (28). On connaît aussi fort bien, puisque AULAKH et STINE (5) l'ont étudiée, la fixation du cuivre par les protéines du lait, que ce soit caséine micellaire, les protéines de la membrane des globules gras, les caséines α et β ou la β-lactoglobuline. Ces diverses liaisons chimiques doivent être considérées comme des liaisons chimiques fortes et, dans l'échelle de pH où nous avons travaillé, peu susceptibles de se briser facilement.

D'autre part, UENO Y., YOSA N. et OHASHI (39) ont de leur côté étudié le devenir du cuivre en solution par chromatographie sur gel de séphadex. Ils ont mis en évidence que le cuivre en solution sous forme de sulfate, élué avec divers tampons, donnait toujours une courbe d'élution de la forme ci-dessous :

Cette courbe est parfaitement symétrique, et elle permet d'affirmer que, si l'ion cuivre est quelque peu retardé par rapport à l'ion sulfate, par des phénomènes d'adsorption, on retrouve cependant à la sortie de la colonne, tout le cuivre qui y est entré. Nous avons de notre côté vérifié, sur le lactosérum supplémenté en cuivre, que la quantité de cuivre éluée n'était pas inférieure à la quantité supplémentée, ce qui permet d'affirmer que, dans nos conditions opératoires, il n'y a aucune fuite de l'élément cuivre. Ce point est important dans la mesure où il démontre l'intérêt de la technique

de chromatographie sur gel dans le problème qui nous intéressait.

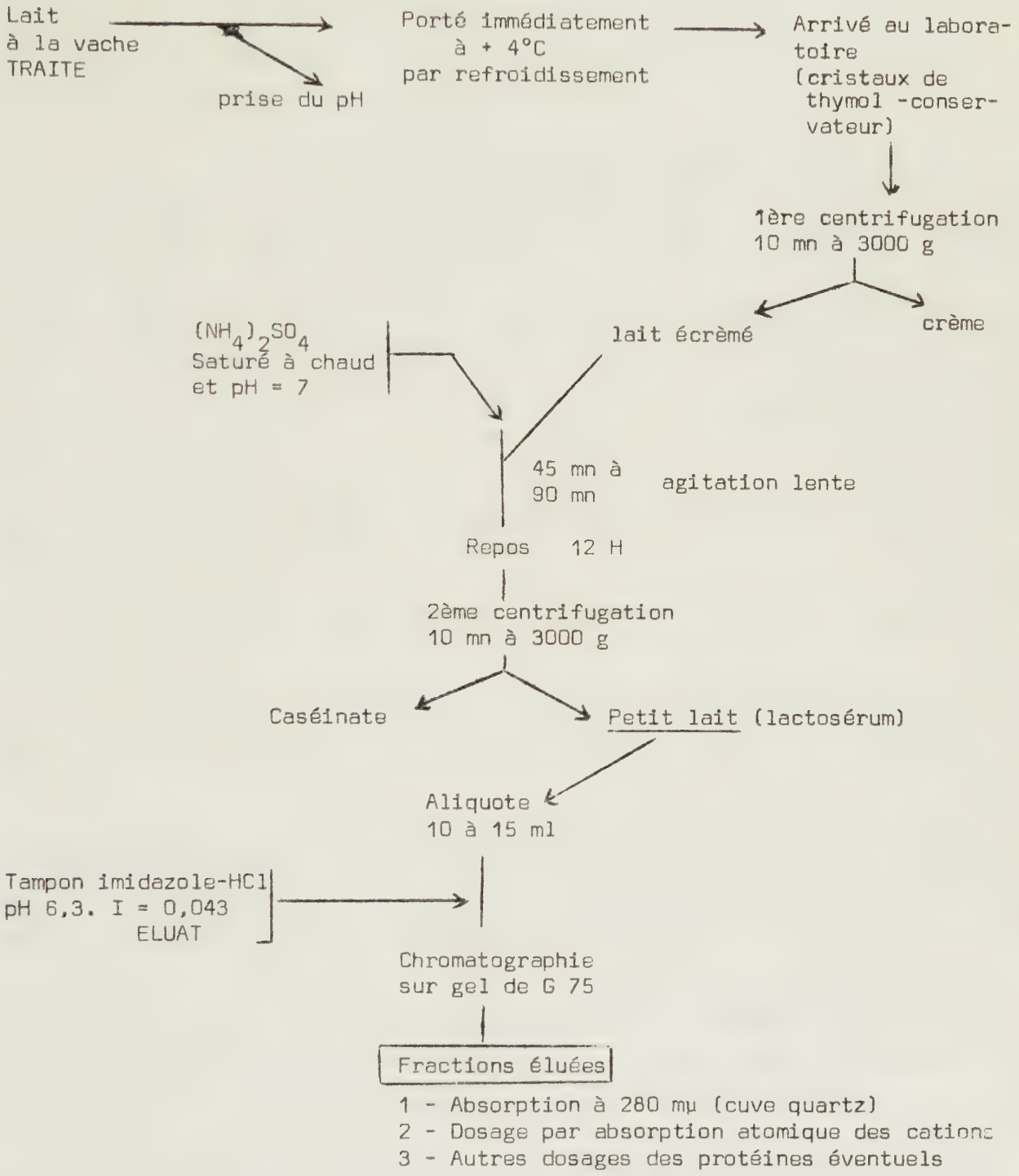
Conclusion

Nous pensons en conclusion, que les méthodes employées et les résultats obtenus nous ont permis de définir une technique analytique adaptée à la séparation des protéines solubles de lactosérums industriels ou préparés en laboratoire. La détermination ultérieure de certains ions (en particulier l'ion cuprique) peut ensuite être réalisée d'une façon rapide et élégante à l'aide de la spectrophotométrie d'absorption atomique sur les fractions séparées par chromatographie sur colonne. Nous donnons après, sous forme de tableau, les étapes fondamentales de la technique expérimentale que nous avons définie.

Définition de la technique analytique de séparation des protéines de lactosérum et de dosage des ions fixés sur ces protéines

Nous pouvons maintenant définir parfaitement un mode opératoire, dont la reproductibilité et l'exactitude ont été vérifiés par nos expériences.

1 - Cas du lait de vache



6 - Discussion des résultats de dosage du cuivre et de sa répartition naturelle.

Les divers résultats que nous avons obtenus présentent un ensemble de données intéressantes, mais ils ne permettent pas de conclure définitivement. Le problème de la répartition du cuivre naturel dans le lait présente en effet beaucoup de points obscurs, et comme les dosages se situaient aux limites de détection de la méthode, les résultats obtenus ne sont pas des critères de référence. Toutefois, ils permettent d'émettre un certain nombre d'idées susceptibles d'un approfondissement.

a - Il est évident que la répartition biochimique du cuivre naturel varie dans le lait au cours des deux premiers mois de l'allaitement, même si la teneur globale reste relativement constante. Ce fait est d'ailleurs en accord avec les besoins physiologiques du veau, et la variation est à la fois qualitative et quantitative. Les résultats trouvés pour la vache montbéliarde rejoignent ceux trouvés dans la littérature antérieure.

b - Le cuivre naturel se répartit sur les protéines du lactosérum de la façon suivante :

- un premier pic, en général très faible, à la fraction d'élution 75 ml, qui correspond à une protéine de fort poids moléculaire, et qui est mis en évidence sur les essais II, V, VI.

- un deuxième pic plus marqué, à la fraction d'élution 210 ml, qui est mis en évidence sur les essais IV, V, VI.

- un troisième pic très proche du précédent, à la fraction d'élution 235-245 ml, qui est mis en évidence sur les essais II, III, IV, V et surtout VI.

- d'autres pics beaucoup plus importants, qui ne correspondent plus aux protéines mais qui, distribués régulièrement à partir de 375 ml d'élution, doivent correspondre à des peptides ou à des complexes cuivre-acides aminés. Ils sont visibles surtout sur les essais II, IV et VI.

Si il ne nous a pas été possible de définir ces constituants chimiques particuliers, nous penchons fortement à les considérer comme des produits de dégradation naturelle des protéines, sous l'action du milieu et de la température par simple hydrolyse au cours des expérimentations.

c - Quant au cuivre supplémenté, que nous avons ajouté sous forme de sulfate à une solution de lactosérum, il appelle un certain nombre de remarques :

I - A la suite de l'essai VI, il est évident que le cuivre se fixe sur les protéines, et sort sous la forme d'un pic majeur, situé dans

les fractions d'élution de 150 à 200 ml, et dont le maximum se situe à la fraction 180 ml.

II - Une deuxième partie de cuivre ajouté se trouve sous diverses formes liées sans doute aux peptides et aux acides aminés, dont les maxima correspondent aux fractions d'élution 355 ml, 385 ml, 405 ml et enfin 435-450 ml. Il est difficile, à cause des limites du collecteur de fractions de voir si le dernier pic correspond ou non à un surplus de cuivre initial qui n'aurait pas été fixé.

III - Enfin une remarque importante s'impose quant à l'évolution du profil protéique du lactosérum en présence de cuivre : en effet, le 4ème et le 5ème pic d'absorption à 280 mμ se sont déplacés sur la gauche, ce qui veut dire que le poids moléculaire des protéines correspondantes s'est accru.

Ces résultats sont en accord avec ceux de BULL (11) qui a étudié l'influence de concentrations croissantes de sulfate de cuivre sur le poids moléculaire de la β-lactoglobuline, et a montré que la molécule passait de 18 000 à 36 000, c'est-à-dire doublait. Ces résultats sont aussi en accord avec ceux de AULAKH et STINE (8) qui ont montré que la β-lactoglobuline était, des protéines du lactosérum, la plus affine pour le cuivre. Nous pouvons donc en conclure que le cuivre a pour effet, à une concentration suffisante (dans notre cas 25 ppm) de doubler le poids moléculaire de deux protéines du lactosérum dont l'une est sûrement la β-lactoglobuline.

Ces résultats ouvrent une nouvelle voie d'exploration des protéines du lactosérum de fromagerie, qui consisterait à étudier leurs affinités relatives pour le cuivre et les éventuelles variations de solubilité qui en découlent. Il conviendrait donc d'étendre la technique que nous avons définie précédemment à l'étude des lactosérums de fromagerie, dont nous verrons plus loin que l'enrichissement suit une loi très particulière dans le cas de la fabrication du fromage d'emmental dans des chaudières en cuivre.

DEUXIEME PARTIE

APPLICATION DE CES RESULTATS AU DOMAINE ALIMENTAIRE

CHAPITRE I

TENEUR EN CUIVRE DES FROMAGES PRESENTES AUX CONCOURS NATIONAUX DE L'EMMENTAL EN 1969 ET 1970

Nous nous sommes de nouveau servis de la technique de spectrophotométrie par absorption atomique pour obtenir des résultats sur un grand nombre de fromages.

L'appareillage et les constantes opératoires déjà donnés dans ce travail sont à la base de ces expérimentations.

Nous avons déjà développé (20) les avantages de l'application de cette méthode à des produits alimentaires tels que les fromages

KIERMEIER et WEISS (23) en réalisant le même type de dosage sur de grandes séries d'échantillons, se sont de leur côté rattachés à une méthode colorimétrique plus précise, mais dont la mise en oeuvre demandait beaucoup trop de temps.

Sans rappeler ici les divers problèmes se rapportant à notre type de dosage, nous citerons les diverses précautions que nous avons été amenés à prendre.

- Prélèvement des échantillons

Nous avons réalisé les dosages à partir des meules de fromage présentées au concours de l'emmental qui se sont tenus à Vesoul en Haute-Saône, respectivement en septembre 1969 et en septembre 1970. Nous avons prélevé les échantillons immédiatement après la coupe des meules et leur appréciation par le jury national. Prélevés à la sonde, ils étaient pris à trois endroits différents du fromage, et d'une façon identique pour chaque meule, dans la partie centrale. Ils étaient conservés ensuite dans des tubes plastiques transparents, fermés hermétiquement et conservés au froid, à la température de + 4°C, jusqu'à leur traitement au laboratoire.

- Précautions particulières prises dans la conduite des déterminations

Ces précautions visent surtout à éviter une contamination extérieure par le cuivre. En fait, cette contamination paraît toujours faible par rapport aux teneurs en cuivre dans le cas particulier des fromages, mais la technique que nous venons de définir a été appliquée aussi au lait et au lactosérum ; le premier problème est celui de l'eau distillée. Nous n'avons jamais eu au laboratoire de l'eau bidistillée dans du quartz, la seule qui réponde vraiment aux critères de pureté. Notre eau bidistillée dans du verre constitue donc notre référence de base. Nous avons utilisé pour chaque dosage une vaisselle importante. Cette vaisselle en pyrex a toujours subi le traitement suivant : lavage au teepoll, nombreux rinçages aux eaux chaude et froide, deux rinçages à l'eau distillée, et au moins un rinçage complet à l'eau bidistillée avant d'être portée à l'étuve. Elle a été ensuite, avant utilisation, conservée à l'abri de la poussière. Malgré ces précautions, il est certain qu'une contamination s'est produite qui a faussé légèrement nos diverses déterminations. Parmi les facteurs principaux de cette contamination, il convient de ne pas oublier le nombre de contenants utilisés au cours des diverses opérations de dosage, le nombre et la pureté des produits chimiques employés. En fait, ce problème de la contamination obligatoire par le cuivre, qui a été discuté à propos du cuivre dans le lait, par Van Duin (41) n'a pas pu être éliminé dans nos conditions de travail, et cela est en fait sans importance car notre méthode n'a pas atteint une précision telle que cette contamination devienne d'une trop grande importance relative par rapport aux teneurs usuelles du cuivre dans les acides.

- Résultats

Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux suivants pour chacune des deux années. Ils sont donnés dans l'ordre de leur obtention

chronologique, qui suit donc la loi du hasard. Il convient de noter que ces résultats ont été obtenus par séries de six, mais ils sont tous exactement comparables à cause de l'excellente reproductibilité de la méthode de dosage.

Teneur en cuivre des meules du concours de 1969

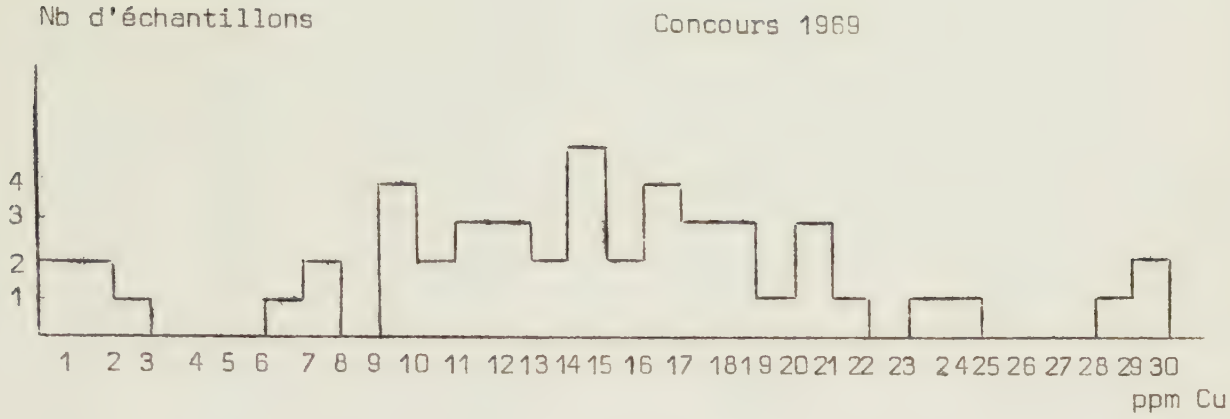
Numéro de l'échantillon	Poids en grammes	Lecture au galvanomètre	Concentration en cuivre en ppm
34	1,600	0,079	18,1
29	1,130	0,028	9,1
59	1,073	0,069	23,3
05	1,182	0,039	12,2
50	0,808	0,065	29,4
13	0,904	0,073	29,4
27	1,186	0,061	18,8
38	1,502	0,102	24,8
36	0,294	0,072	20,3
42	1,504	0,009	2,3
37	1,363	0,056	15,1
54	1,114	0,043	14,1
41	1,200	0,046	14,0
49	0,938	0,025	9,9
25	1,323	0,003	0,9
33	1,014	0,033	12,0
22	1,459	0,042	10,6
06	1,615	0,041	9,3
55	1,481	0,050	12,3
56	1,130	0,019	6,2
16	1,205	0,063	19,2
02	0,914	0,028	11,2
26	1,209	0,024	7,3
53	0,956	0,020	7,8
15	1,020	0,047	16,9
07	1,243	0,050	14,7
28	0,972	0,026	9,8

Numéro de l'échantillon	Poids en grammes	Lecture au galvanomètre	Concentration en cuivre en ppm
47	0,851	0,038	16,4
39	0,840	0,004	1,8
32	0,810	0,033	14,9
48	1,069	0,048	16,5
4	1,243	0,062	18,2
40	0,906	0,043	17,4
30	1,154	0,051	16,2
45	1,302	0,041	11,5
39 bis	1,220	0,005	1,6
20	1,565	0,004	1,0
14	1,371	0,081	21,5
11	1,180	0,057	17,6
12	1,062	0,043	14,8
31	1,514	0,059	14,2
52	1,403	0,053	13,8
35	1,456	0,061	15,3
58	1,280	0,101	28,9
46	1,189	0,042	12,9
18	0,931	0,028	11,0
1	1,186	0,067	20,6
44	0,941	0,046	17,9
57	0,873	0,050	20,9
43	0,795	0,002	1,1

- Premières remarques

Sur les 49 échantillons dosés, 5 seulement, dont la teneur en cuivre est inférieure à 5 ppm, correspondent à une nouvelle technologie de fabrication dans l'acier inoxydable, tandis que les autres correspondent à la fabrication traditionnelle dans les cuves en cuivre.

L'histogramme de répartition donne le nombre d'échantillons correspondant à chaque teneur en cuivre



Comme on peut le voir sur cette représentation des résultats, 3 fromages se détachent nettement des autres, car leur teneur est supérieure à 25 ppm. Leur contamination par le cuivre paraît très forte et "anormale" dans les conditions théoriques de fabrication.

Trois autres fromages présentent aussi des concentrations en cuivre anormalement faibles, car comprises entre 6 et 8 ppm.

Teneur en cuivre des meules du concours de 1970

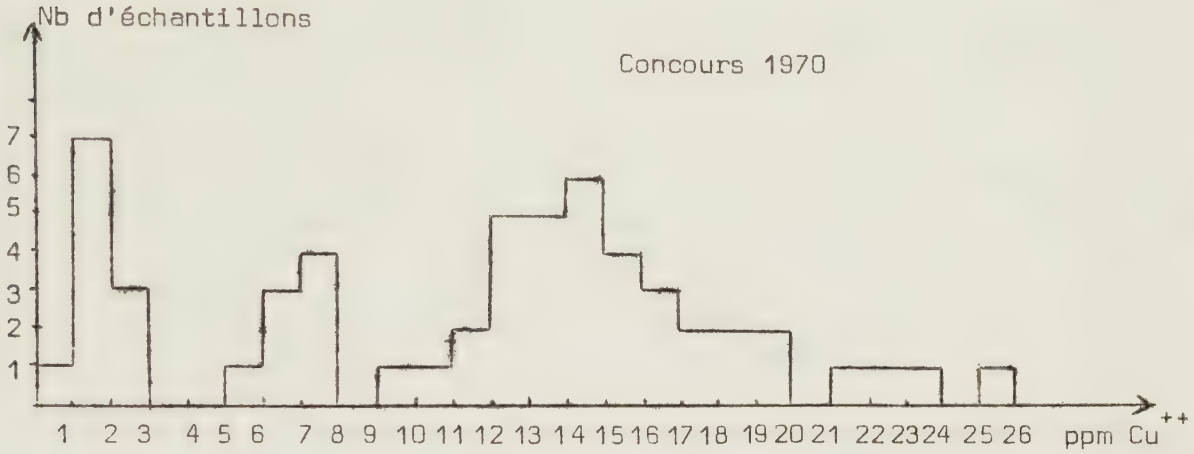
N° des meules	Poids de l'échantillon en grammes	Lecture au galvanomètre	Concentration en cuivre en ppm
1	1,091	0,023	7,8
2	1,183	0,026	8,0
3	1,021	0,041	14,7
4	1,188	0,047	14,5
5	1,165	0,040	12,5
6	1,108	0,042	13,9
7	1,279	0,045	12,9
8	1,136	0,037	11,9
9	1,168	0,058	18,2
10	0,951	0,041	15,8
11	1,009	0,042	15,3
12	1,005	0,042	15,3
13	1,069	0,006	2,1
14	1,330	0,005	1,5

15	1,178	0,066	18,4
16	1,084	0,058	19,6
17	1,284	0,047	13,4
18	1,280	0,044	12,6
19	0,979	0,039	14,6
20	1,196	0,053	16,2
21	1,104	0,056	18,6
22	1,040	0,048	17,1
23	1,318	0,084	23,3
24	0,922	0,065	25,8
25	1,127	0,021	6,9
26	1,262	0,050	14,5
27	1,261	0,061	17,6
28	1,006	0,036	13,1
29	1,202	0,024	7,3
30	1,178	0,004	1,3
31	0,968	0,031	11,9
32	1,311	0,052	14,5
33	1,033	0,048	17,0
34	0,803	0,016	7,5
35	1,068	0,033	10,2
36	1,030	0,046	16,3
37	0,910	0,031	12,5
38	1,214	0,004	1,2
39	0,944	0,006	2,4
40	1,037	0,004	1,4
41	0,968	0,006	2,3
42	1,203	0,004	1,2
43	1,198	0,003	1,0
44	1,048	0,005	1,9
45	1,101	0,038	12,7
46	1,256	0,046	13,4
47	1,238	0,076	22,4
48	1,119	0,067	21,8
49	1,249	0,022	6,4
50	0,842	0,036	15,7
51	0,980	0,026	9,2
52	1,011	0,037	13,4
53	0,939	0,037	14,5
54	1,054	0,016	5,7
55	1,410	0,005	1,4
56	1,300	0,024	6,8

- Premières remarques pour 1970

Sur les 56 échantillons analysés, 11 sont issus d'une technologie nouvelle et 45 de l'ancienne ; donc le pourcentage des fromages issus de la technologie nouvelle a sensiblement doublé en un an.

L'histogramme de répartition des fromages en fonction de la concentration en cuivre est mieux différencié que celui de l'année précédente. Il met en évidence trois groupes de fromages correspondant à trois technologies :
Le premier groupe (Cu) 3 ppm correspond à l'acier inoxydable
Le troisième groupe (Cu) 9 ppm correspond à l'ancienne technologie dans les chaudières en cuivre.



Enfin, nous pensons qu'il faut considérer le deuxième groupe, le groupe des 8 meules dont les concentrations en cuivre sont comprises entre 5 et 8 ppm comme celui des fromages fabriqués suivant l'ancienne technologie dans des cuves en cuivre après qu'une première fabrication a déjà eu lieu le même jour. En effet, KIERMEIER et JACKL (24) assurent que l'enrichissement technologique minimum du caillé dans la cuve en cuivre est de l'ordre de 9 à 10 ppm. De leur côté, SCWAB et OCHEN (36) ont constaté que, dans le cas de fromageries fabriquant en deux charges consécutives, les fromages de la deuxième charge étaient environ de moitié moins riches en cuivre que ceux de la première. Ces 8 meules correspondaient donc logiquement à cette fabrication en deuxième charge, réalisée suffisamment rapidement après la première pour que la couche d'oxydation n'ait pas le temps de se former.

CHAPITRE II

METHODES D'APPRECIATION DE LA QUALITE ORGANOLEPTIQUE DES FROMAGES

A - Critères d'appréciation.

Il existe traditionnellement un certain nombre de critères qui permettent à des spécialistes de juger dans l'absolu et comparativement, la qualité des fromages.

Ainsi, en 1895, à Berne, le Jury de l'exposition suisse d'agriculture avait-il déjà adopté un système de points pour classer les divers fromages :

extérieur..... maximum 5 points
finesse de la pâte..... maximum 5 points
ouverture..... maximum 10 points

La technologie (et une meilleure connaissance scientifique du fromage) a fait évoluer cette classification, d'autant plus qu'il a fallu dans un deuxième temps tenir compte aussi de l'opinion du consommateur, qui était aussi concerné.

Les fromages auxquels nous nous sommes intéressés sont ceux qui ont été présentés et jugés aux Concours Nationaux de l'emmental 1969 et 1970 à Vesoul, en Haute-Saône. Leur tableau de pointage porte de 0,5 à 5, et le déclassement est possible dans le cas où le défaut est trop important. Les différentes rubriques sont :

extérieur-forme-conservation..... 0,5 à 5 points
pâte et couleur..... 0,5 à 5 points
ouverture..... 0,5 à 5 points
goût et arôme..... 0,5 à 5 points

Total des points 20

Ce tableau de notation permet, à l'aide d'un certain nombre de Jurys,de classer les fromages d'une façon générale chaque année au Concours.

Mais notre problème était un peu différent, car nous voulions nous limiter à la rubrique goût et arôme, de façon à pouvoir rapprocher les résultats obtenus avec ceux du dosage chimique. Nous avons donc été amenés

à reconsidérer l'ensemble des résultats obtenus pour sélectionner la seule rubrique goût et arôme. De plus, et comme le classement organoleptique ne suit pas exactement une logique scientifique, nous avons été amenés à utiliser les lois statistiques pour écarter de notre étude les jugements qui étaient trop différents les uns des autres. Ainsi, nous avons obtenu des séries homogènes pour lesquelles ne s'est posé aucun problème de rapprochement avec les résultats analytiques.

B - Etude des tests organoleptiques

En nous appuyant sur nos cours de statistique (II) et sur certaines publications, nous nous sommes aperçus que pour chaque note donnée à la rubrique goût et arôme, il nous fallait calculer la moyenne, l'écart absolu, la variance σ^2 et l'écart type σ, tous ces calculs devant nous permettre de définir le coefficient de variation $\nu = \frac{100\ \sigma}{\bar{x}}$ qui permet de comparer exactement entre elles les diverses séries de notes attribuées à chaque fromage par les jurys. Tous les calculs ne seront pas donnés ici, mais seulement leurs résultats appréciés en une page.

Ce Coefficient de variation $\nu = \frac{100}{\bar{x}}$ est exprimé en centièmes mais c'est un nombre pur. Plus il est élevé, plus la série est dispersée ; ce qui signifie dans notre cas, que la série de notes attribuées n'est pas homogène.

Il se pose alors le problème de la détermination de la limite qui permettra d'évaluer si la série de notes attribuées à un fromage est homogène ou non. En fonction des limites de chaque note, comprise entre 0,5 et 5, et du petit nombre de jurys au total, il nous a paru rationnel de la fixer à 0,40. Mais ce chiffre, quoique arbitraire, reste très logique car il n'élimine en fait qu'un petit nombre d'échantillons pour lesquels la notation n'a pas été homogène, comme le prouve l'analyse précise des résultats.

Cette étude statistique de la série des notations des divers fromages a été faite en 1969 et en 1970, et nous donnerons l'ensemble des deux tableaux. Les résultats du dosage chimique et leur comparaison avec les tableaux statistiques permettront la discussion.

C - Résultats (voir pages suivantes)

Evaluation du critère "Gout et arôme" au Concours national de l'emmenthal 1969 (notation de 0.5 à 5.0)

Référence	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	20	22	25	26	27	28	29	30
Jury 1	2.5	1.5		2.0	3.0	2.0	1.0		2.5		1.5	3.0	1.5	1.0	4.5	4.5	2.0	1.5	1.5	3.5	3.0	4.0	4.0	2.0	1.5
Jury 2	-	3.5		-	1.5	-	2.5		-		-	3.5	1.5	1.0	3.0	2.5	-	3.0	2.5	4.0	3.5	2.0	3.0	2.0	1.0
Jury 3	2.0	3.5		2.0	2.5	-	3.0		-		-	3.0	2.5	2.0	4.0	3.0	-	4.0	4.0	4.0	4.5	1.0	3.0	4.0	2.0
Jury 4	2.0	2.0		1.0	3.0	1.0	3.0		1.5		2.0	3.5	3.0	2.0	3.5	3.5	2.0	3.0	2.5	3.5	3.5	2.5	3.5	3.0	0.5
Jury 5	1.5	1.5		1.5	2.0	1.5	1.0		1.0		2.0	2.0	2.0	2.5	2.5	2.0	2.0	2.5	0.5	0.5	2.0	2.5	3.0	1.5	2.0
Jury 6	1.0	2.0		2.5	1.0	1.0	0.5		0.5		1.5	2.5	3.0	1.0	2.0	3.0	0.5	2.0	2.5	3.0	2.5	2.0	2.5	3.0	1.0
Jury 7	2.5	2.0		2.5	2.5	2.5	3.0		3.0		3.0	3.0	2.5	2.5	3.5	4.0	2.0	3.0	3.5	4.5	2.0	3.5	3.0	3.5	3.0
Jury 9	3.5	4.0		2.5	3.0	3.0	4.0		3.5		4.0	3.0	3.5	2.0	4.5	3.5	3.0	4.0	4.0	3.0	4.0	3.5	4.0	3.5	3.5
Jury 10	2.5	4.0		2.5	3.0	2.5	3.5		2.0		2.0	3.5	4.0	2.0	4.5	4.5	2.5	3.5	4.5	4.5	4.5	2.5	4.0	2.5	2.0
Jury 11	2.5	3.0		2.5	-	-	2.0		2.0		-	4.0	2.5	1.0	4.0	3.0	-	3.0	3.0	3.0	2.5	3.0	2.5	2.5	3.0
Jury 13	3.0	3.5		2.5	3.0	3.5	3.0		2.0		3.0	3.0	0.5	2.0	4.0	3.0	2.5	4.0	2.0	2.5	2.0	2.0	2.5	2.0	3.5
Jury 14	2.0	2.0		2.0	2.0	-	2.5		1.5		-	2.0	3.0	1.0	3.0	3.5	2.0	3.0	3.0	3.0	4.0	3.0	3.0	2.0	1.5
Somme	25.0	32.5		23.5	26.5	17.0	29.0		19.5		19.0	36.0	29.5	20.0	43.0	40.0	18.5	36.5	33.5	39.0	38.0	31.5	38.0	31.5	24.5
Moyenne	2.3	2.7		2.1	2.4	2.1	2.4		1.9		2.4	3.0	2.4	1.7	3.5	3.3	2.1	3.0	2.8	3.3	3.2	2.6	3.2	2.6	2.0
Variance	0,426	0,836		0,238	0,446	0,736	1,07		0,725		0,430	0,333	0,857	0,348	0,626	0,545	0,312	0,563	1,19	1,07	0,848	0,631	0,309	0,549	0,855
Ecart-type.	0,653	0,914		0,488	0,668	0,858	1,03		0,852		0,656	0,544	0,926	0,590	0,791	0,738	0,559	0,750	1,09	1,03	0,921	0,734	0,554	0,740	0,925
Coefficient de variation	28,4	33,9		23,2	18,6	40,9	42,9		44,8		29,3	19,1	38,6	34,7	22,6	21,8	26,6	25,0	38,9	31,2	28,8	30,5	17,3	28,5	46,3

27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
5	2.0	2.5	1.0	2.5	2.0	2.0	1.5	1.5	1.0	1.0	2.0	1.5	1.0	2.0	2.0	3.0	2.0	2.5	2.0	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0	3.0	3.0	2.0	2.
5	3.0	4.0	2.5	3.0	3.5	3.0	2.0	3.0	2.5	3.0	2.5	3.5	2.5	3.5	1.5	3.5	1.0	3.0	4.0	1.0	2.0	2.0	3.5	3.5	4.0	3.5	2.0	3
0	1.0	2.0	1.0	2.5	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.5	2.0	1.5	2.0	0.5	2.0	0.5	3.0	2.5	0.5	0.5	3.5	3.0	2.5	2.5	2.0	3.0	3
0	1.5	2.5	2.5	3.5	4.0	4.0	2.0	2.5	2.5	2.5	3.5	4.0	2.5	3.0	2.0	2.5	1.5	2.5	2.0	1.5	1.5	1.5	3.5	1.5	3.0	2.0	1.5	3
0	3.8	3.8	2.1	4.0	3.8	3.3	2.5	2.1	4.0	2.0	2.0	1.2	2.0	2.1	1.8	2.7	1.0	2.5	2.0	1.1	1.7	2.2	3.7	2.5	3.2	4.3	1.0	1
0	2.0	3.0	2.0	5.0	4.0	4.0	3.0	4.0	3.0	3.0	3.0	4.0	3.0	5.0	3.0	4.0	3.0	2.0	3.0	2.0	2.0	4.0	5.0	3.0	3.0	3.0	5.0	4.
5	1.0	1.0	0.5	2.5	2.0	2.0	2.5	2.0	3.0	1.0	1.5	1.0	0.5	2.5	2.0	3.0	0.5	2.0	1.0	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0	1.0	1.
5	2.0	2.0	3.0	2.0	2.0	2.5	2.5	3.5	2.0	1.0	2.5	2.5	1.5	2.5	1.5	2.0	1.5	1.5	2.5	–	–	2.5	2.5	1.0	2.0	2.5	2.0	2
5	2.5	1.5	3.0	4.0	3.0	3.0	1.5	3.5	3.5	3.0	3.0	3.0	1.5	2.0	3.0	3.0	1.5	3.0	2.5	–	–	2.0	3.5	2.5	3.0	3.5	3.5	2
0	3.0	3.0	1.0	3.0	3.0	2.5	2.0	3.0	3.0	2.5	3.0	3.0	1.5	3.0	2.0	4.0	2.0	2.0	1.0	1.0	3.0	2.0	3.0	3.5	3.5	2.5	3.0	3.
5	2.0	2.0	2.0	2.0	3.0	4.0	2.5	1.5	1.5	2.0	1.5	1.5	2.0	3.0	0.5	2.5	1.0	2.0	2.0	2.0	2.5	2.0	2.0	2.0	3.5	3.5	2.0	2
3.0	23.7	27.2	20.6	34.0	32.3	32.3	24.0	28.6	28.0	21.9	27.0	27.2	19.5	30.6	19.8	32.7	15.5	26.0	24.5	10.6	14.7	24.7	32.7	25.0	32.7	31.8	26.0	27
3.5	2.2	2.5	1.9	3.1	2.9	2.9	2.2	2.6	2.6	2.0	2.5	2.5	1.8	2.8	1.8	3.0	1.4	2.4	2.2	1.2	1.6	2.3	3.0	2.3	3.0	2.9	2.4	2
20	0,730	0,830	0,760	0,850	0,680	0,650	0,810	0,730	0,770	0,750	0,420	1,22	0,520	0,800	0,560	0,410	0,540	0,250	0,720	0,310	0,740	0,710	1,16	0,770	0,32	0,580	1,40	0,9
10	0,850	0,910	0,870	0,540	0,230	0,810	0,460	0,250	0,880	0,870	0,650	1,10	0,720	0,900	0,810	0,640	0,740	0,500	0,850	0,560	0,860	0,840	1,08	0,880	0,610	0,760	1,15	0,8
3	39,5	36,8	46,5	30,6	28,2	27,6	21,2	32,9	34,5	43,4	26,5	44,6	40,6	32,2	45,1	21,4	52,2	21,4	38,1	47,2	52,4	37,4	36,1	38,6	20,7	26,4	50,1	35,

Evaluation du critère "gout et arôme" au Concours national de l'emmental 1970 (notation de 0.5 à 5.0)

Référence	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Jury 1	2.5	2.0	1.5	3.0	1.5	1.5	2.0	1.5	1.0	3.0	2.5	3.0	4.0	2.5	3.0	2.5	2.5	1.0	1.0	2.0	2.5	2.5	3.0	4.5	2.0	2.5
Jury 2	3.5	2.0	2.0	3.5	3.5	2.5	3.0	2.0	2.0	3.0	3.0	3.5	2.0	2.0	3.0	2.5	3.5	3.0	3.0	3.5	4.0	3.0	4.0	4.0	3.0	3.5
Jury 3	3.5	3.0	3.0	2.0	1.0	2.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.5	3.5	2.0	1.0	0.5	2.0	3.5	2.0	2.5	2.0	3.5	2.5	2.5	2.5	3.5	3.5
Jury 4	3.5	3.0	3.0	3.0	2.5	3.0	2.0	3.0	2.0	3.5	3.0	3.0	2.0	2.0	2.5	2.5	3.0	3.0	2.5	3.0	3.5	2.0	3.0	4.0	2.5	3.0
Jury 5	1.0	1.3	1.0	3.7	3.5	2.1	2.0	0.9	2.5	3.3	4.2	2.5	3.7	1.9	2.9	2.0	1.7	1.3	1.5	1.8	3.7	4.0	4.0	4.0	3.0	3.8
Jury 6	3.0	3.0	2.0	3.0	5.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	4.0	4.0	4.0	2.0	4.0	3.0	5.0	3.0	3.0	4.0	5.0	3.0	5.0	5.0	3.0	4.0
Jury 7	2.0	3.0	1.5	3.5	0.5	1.5	0.5	1.5	0.5	1.0	2.5	3.0	3.0	0.5	3.5	2.5	2.0	1.5	2.0	2.0	2.5	2.5	3.5	4.0	2.5	3.0
Jury 8	3.0	1.5	1.0	3.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	2.0	2.5	2.0	3.0	2.0	3.0	3.5	3.0	2.0	2.5	2.5	3.0	2.0	2.5	3.5	2.0	3.0
Jury 9	1.5	2.5	2.0	4.0	–	2.5	2.0	3.0	–	4.0	3.5	3.5	3.5	3.0	3.5	3.5	3.5	3.0	2.5	2.5	3.0	2.0	3.0	3.5	2.0	4.0
Jury 10	3.0	3.5	2.0	2.0	3.5	2.5	2.5	1.0	2.0	2.0	2.5	3.0	4.0	1.0	3.5	1.5	2.5	2.5	3.0	3.5	2.0	2.0	2.5	4.0	2.0	3.5
Jury 11	1.0	4.0	3.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.0	3.0	2.5	3.0	1.5	2.0	2.0	3.0	2.5	3.5	4.0	2.0	3.5
Somme	27.5	28.8	22.0	32.7	24.0	23.6	23.0	19.9	16.0	28.3	31.7	33.5	33.7	19.9	32.4	28.0	33.2	23.8	25.5	28.8	35.7	28.0	35.5	43.0	27.5	37.3
Moyenne	2.5	2.6	2.0	2.9	2.4	2.1	2.1	1.8	1.6	2.6	2.9	3.1	3.1	1.8	2.9	2.5	3.0	2.1	2.3	2.6	3.2	2.5	3.2	3.9	2.5	3.4
	0,950	0,690	0,550	0,510	2,10	0,400	0,440	0,930	0,660	0,970	0,600	0,320	0,700	0,510	0,880	0,370	0,780	0,590	0,410	0,580	0,680	0,370	0,610	0,390	0,300	0,230
	0,975	0,830	0,740	0,710	1,45	0,630	0,660	0,850	0,810	0,980	0,780	0,570	0,840	0,710	0,940	0,610	0,880	0,770	0,640	0,760	0,830	0,610	0,780	0,630	0,550	0,470
	38,9	31,7	37,1	23,9	60,4	29,5	31,8	47,3	50,6	38,1	27,0	18,7	27,3	39,6	30,8	24,0	29,3	35,6	27,7	29,2	25,5	24,0	23,6	16,0	21,9	14,0

31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	46	47	48	49	50	52	53	54	55	56	57	58	59
1.5	1.5	2.0	3.0	2.0	3.0	3.0	4.0	2.0	3.0	3.0	2.0	2.0	2.5	1.0	1.0	3.0	4.0	1.5	1.5	3.0	2.0	4.0	1.0	1.0	3.0	3.0
–	2.5	2.5	3.0	3.0	3.0	2.0	2.0	2.5	3.0	1.5	–	2.0	3.5	3.0	1.5	2.5	4.0	–	2.5	2.5	1.5	2.5	2.5	–	3.0	1.0
–	3.0	4.0	3.5	2.5	2.5	2.5	2.0	4.0	2.5	2.0	–	4.0	2.5	2.0	1.0	3.0	4.0	2.0	2.5	2.5	2.0	2.0	3.0	2.0	2.0	2.0
2.0	2.5	3.5	2.5	1.5	3.0	3.0	2.5	4.0	4.0	2.5	2.0	3.0	2.0	1.5	1.5	2.0	4.0	1.0	2.0	1.0	3.0	1.5	1.5	1.5	2.0	2.5
1.5	2.0	2.0	2.5	1.5	2.0	3.0	2.5	2.0	4.0	2.5	1.5	3.0	3.0	2.5	1.5	2.0	3.0	1.5	2.0	2.5	1.0	3.0	2.0	1.0	2.5	3.5
1.0	3.0	1.5	3.0	2.5	2.5	3.5	3.0	3.0	3.0	0.5	0.5	3.0	1.5	2.5	0.5	2.5	2.5	1.0	1.0	2.5	0.5	1.5	1.5	1.0	1.0	1.0
2.5	3.5	2.0	3.0	4.0	2.5	3.0	3.5	3.5	3.0	4.0	2.5	1.0	4.0	2.5	1.5	2.5	3.5	2.0	3.5	3.0	2.0	2.0	2.5	2.0	2.5	2.5
2.0	3.5	2.0	3.0	4.0	4.5	3.0	4.0	3.0	4.0	4.0	4.5	2.5	3.5	3.0	2.5	2.5	3.0	4.0	3.0	3.0	3.5	3.5	4.0	3.5	2.0	3.0
2.0	4.0	4.5	3.5	3.5	4.0	4.0	3.0	3.5	4.0	5.0	1.5	3.5	2.5	2.5	2.5	3.0	3.5	3.0	3.5	2.5	3.5	3.5	3.0	1.5	2.5	2.5
–	3.0	3.0	3.5	3.0	4.0	3.0	3.0	4.5	4.5	2.0	–	2.5	2.0	2.5	2.5	3.0	4.0	–	2.5	3.0	3.5	2.0	3.5	3.0	3.0	–
2.0	4.0	2.0	2.5	3.5	4.0	3.5	3.0	2.5	3.5	3.5	2.5	4.0	3.5	2.0	2.5	3.0	2.5	3.5	1.0	2.0	3.5	2.5	2.0	1.5	2.0	3.0
–	2.5	2.5	3.5	2.0	2.5	3.0	2.5	3.5	4.0	3.5	–	1.5	1.5	3.0	2.0	2.5	3.0	–	1.5	3.0	2.0	3.0	2.5	1.0	1.5	2.0
14.5	35.0	32.5	37.5	33.5	36.0	37.5	34.0	39.0	42.5	34.5	15.0	33.0	31.5	27.5	20.5	32.0	42.0	18.5	26.5	31.0	28.0	31.5	28.5	17.5	28.0	26.0
1.8	3.0	2.7	3.1	2.8	3.0	3.1	2.8	3.3	2.5	2.9	1.9	2.7	2.6	2.3	1.7	2.7	3.5	2.1	2.2	2.6	2.3	2.6	2.4	1.6	2.3	2.4
0,184	0,541	0,769	0,214	0,852	0,417	0,297	0,307	0,648	0,354	1,55	0,423	0,856	0,589	0,278	0,435	0,140	0,333	0,943	0,700	0,368	1,01	0,714	0,589	0,355	0,390	0,596
0,430	0,736	0,877	0,468	0,923	0,646	0,545	0,554	0,805	0,595	1,25	0,651	0,925	0,768	0,528	0,660	0,375	0,577	0,866	0,837	0,607	1,01	0,845	0,768	0,596	0,625	0,772
23,9	24,5	32,5	14,9	33,0	21,5	17,6	19,8	24,4	17,0	43,1	34,3	34,3	29,5	23,0	38,8	13,9	16,5	41,2	38,0	23,3	43,9	32,5	32,0	37,3	27,2	32,2

CHAPITRE III

DEFINITION D'UNE RELATION ENTRE LA TENEUR EN CUIVRE ET LE GOUT

Nous allons d'abord rassembler sur un même tableau les deux classements des divers fromages quant aux deux critères que nous avons étudiés, c'est à dire la notation exprimée en points du "goût et arôme" et la teneur en cuivre exprimée en ppm.

Ce rapprochement réalisé pour chacune des deux années permet en effet un éventuel rapprochement des deux classements et facilite leur comparaison. De la comparaison seront tirés les éventuelles conclusions.

Nous nous apercevons sur le tableau A suivant que les trois meilleurs fromages, qui dépassent de loin les autres, ont respectivement des teneurs en cuivre égales à 16,9, 17,4 et 16,5 ppm de cuivre.

Ce résultat présente un intérêt certain. Toutefois, vu le petit nombre de meules obtenues par la "nouvelle technologie", il est assez difficile de tirer des résultats ci-après une loi générale. En effet, les deux échantillons correspondant aux meules n° 39 et 25 se placent fort bien quand au critère "goût et arôme".

Recherche de la relation pouvant exister entre le goût et la teneur en cuivre

A - Résultats groupés pour 1969

N° de l'échantillon	Nb. de points goût	Rang	Concentration en cuivre
15	43	1	16,9
40	42,5	2	17,4
48	42	3	16,5
16	40	4	19,2
39	39	5	1,7
25	39	5	1,0
26	38	7	7,3
28	38	7	9,8
334	37,5	9	18,1
37	37,5	9	15,1
20	36,5	11	1,0
12	36	12	14,8
36	36	12	20,3
32	35	14	14,9
41	34,5	15	14,0
38	34	16	24,8
35	33,5	17	15,2
22	33,5	17	10,6
43	33	19	1,1
33	32,5	20	12,0
02	32,5	20	11,2
45	32	22	10,6
44	31,5	23	17,9
55	31,5	23	12,3
27	31,5	23	18,8
29	31,5	23	9,1
53	31	27	7,8
13	29,5	28	29,4
07	29	28	14,7
56	28,5	30	6,2
54	28	31	14,1
58	28	31	28,9
46	27,5	33	12,9
52	26,5	34	13,8
30	24,5	35	16,2
47	20,5	36	16,4
14	20	37	21,5

B - Résultats groupés pour 1970

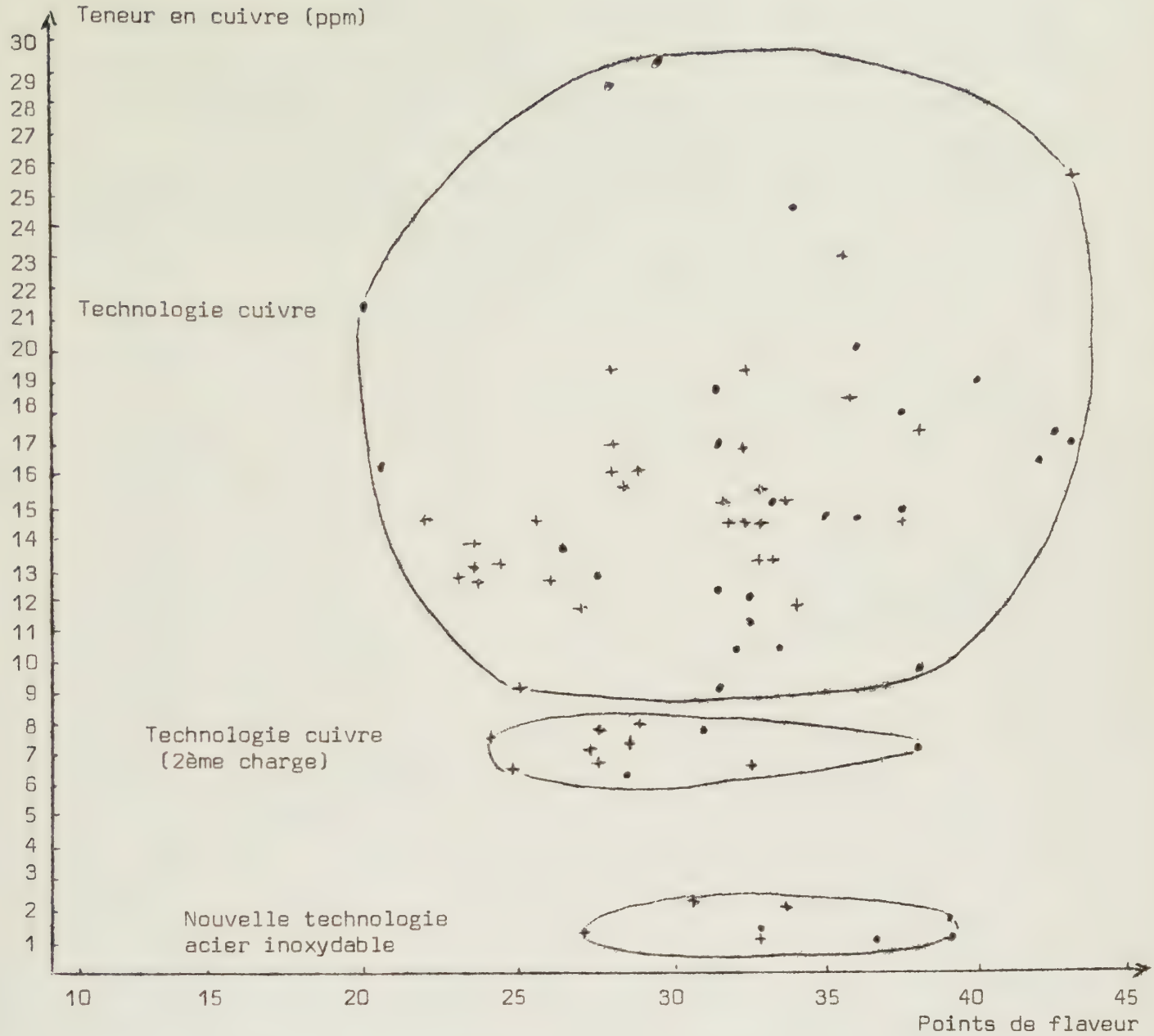
N° de l'échantillon	Nb. de points de flaveur	Rang	Cu en ppm	Points au classement général
24	43	1	25,8	14,9
27	38	2	17,6	13,7
26	37,3	3	14,5	13,1
21	35,7	4	18,6	13,7
23	35,5	5	23,3	13,2
31	34	6	11,9	12,7
13	33,7	7	2,1	13,3
12	33,5	8	15,3	11,9
17	33,2	9	13,4	11,4
4	32,7	10	14,5	11,1
43	32,7	10	1,0	12,8
50	32,7	10	15,7	11,0
52	32,7	10	13,4	11,6
56	32,5	14	6,8	11,5
15	32,4	15	19,4	13,5
32	32,3	16	14,5	12,5
33	32,3	16	17,0	11,7
53	31,8	18	14,5	12,2
11	31,7	19	15,3	12,7
41	30,6	20	2,3	10,3
20	28,8	21	16,2	11,4
2	28,8	21	8,0	10,9
35	28,6	23	7,5	9,1
10	28,3	24	15,8	10,9
16	28,0	25	19,6	10,9
22	28,0	25	17,1	11,6
36	28,0	25	16,3	9,8
1	27,5	28	7,8	10,5
25	27,5	28	6,9	10,4
29	27,2	30	7,3	10,7
38	27,0	31	11,9	12,2
55	27,0	31	1,4	10,4
45	26,0	33	12,7	10,3
19	25,5	34	14,6	11,6
51	25,0	35	9,2	8,7
49	24,7	36	6,4	10,5
46	24,5	37	13,4	9,5
34	24,0	38	7,5	9,1
18	23,8	39	12,6	11,0
28	23,7	40	13,1	10,7
6	23,6	41	13,9	7,7
7	23,0	42	19,9	9,4
3	22,0	43	14,4	10,0

Pour le concours de 1970, les résultats, par rapport à ceux de 1969, sont beaucoup plus intéressants car non seulement ils s'appliquent à un nombre supérieur de fromages, mais de plus, le pourcentage des fromages obtenus en "technologie nouvelle" est beaucoup plus significatif. Ainsi, il faut d'abord constater que,le nombre des Jurys étant passé de 12 à 11,le meilleur fromage obtient cependant un total de 43 points, équivalent à celui du meilleur fromage de 1969, ce qui laisse supposer que sa qualité est encore supérieure. Or ce fromage est aussi celui qui a la plus forte teneur en cuivre. De plus, ainsi que le montre la note globale qui lui a été attribuée, ce fromage, ayant obtenu 14,9/20, arrive très largement en tête du concours, ce qui permet d'affirmer que l'ancienne technologie peut produire des fromages de qualité très supérieure dans tous les domaines d'appréciation de la qualité.

Une deuxième constatation s'impose lorsqu'on examine deux meules ayant une même provenance, c'est-à-dire ayant en théorie reçu un traitement constant de fabrication traditionnelle et d'affinage ; pour ces couples là, c'est en effet la meule qui possède la plus forte teneur en cuivre qui est jugée de goût et d'arôme supérieurs à la précédente (exemple : couple 22-21, couple 24-23, couple 27-26, couple 20-19, couple 50-49). Ce fait présente une indication intéressante, car, pour une technologie a priori identique, il prouve que le cuivre favorise la formation des composants favorables au goût et à l'arôme. Seuls deux couples ne répondent pas à cette loi ; le couple 29-28, dont les deux fromages ont mauvais goût, et le couple 53-52 dont les concentrations sont sensiblement les mêmes et les goûts peu différents. Néanmoins cette brève étude permet d'affirmer que, s'ajoutant à de nombreux autres paramètres liés au fromage lui-même et à ses conditions de maturation, le cuivre possède une influence prépondérante dans la formation de l'arôme et du bon goût des emmentals.

Nous sommes maintenant amenés à représenter sur un même graphique les résultats des deux concours, les points du goût figurant en ordonnée et les concentrations en cuivre en abscisse.

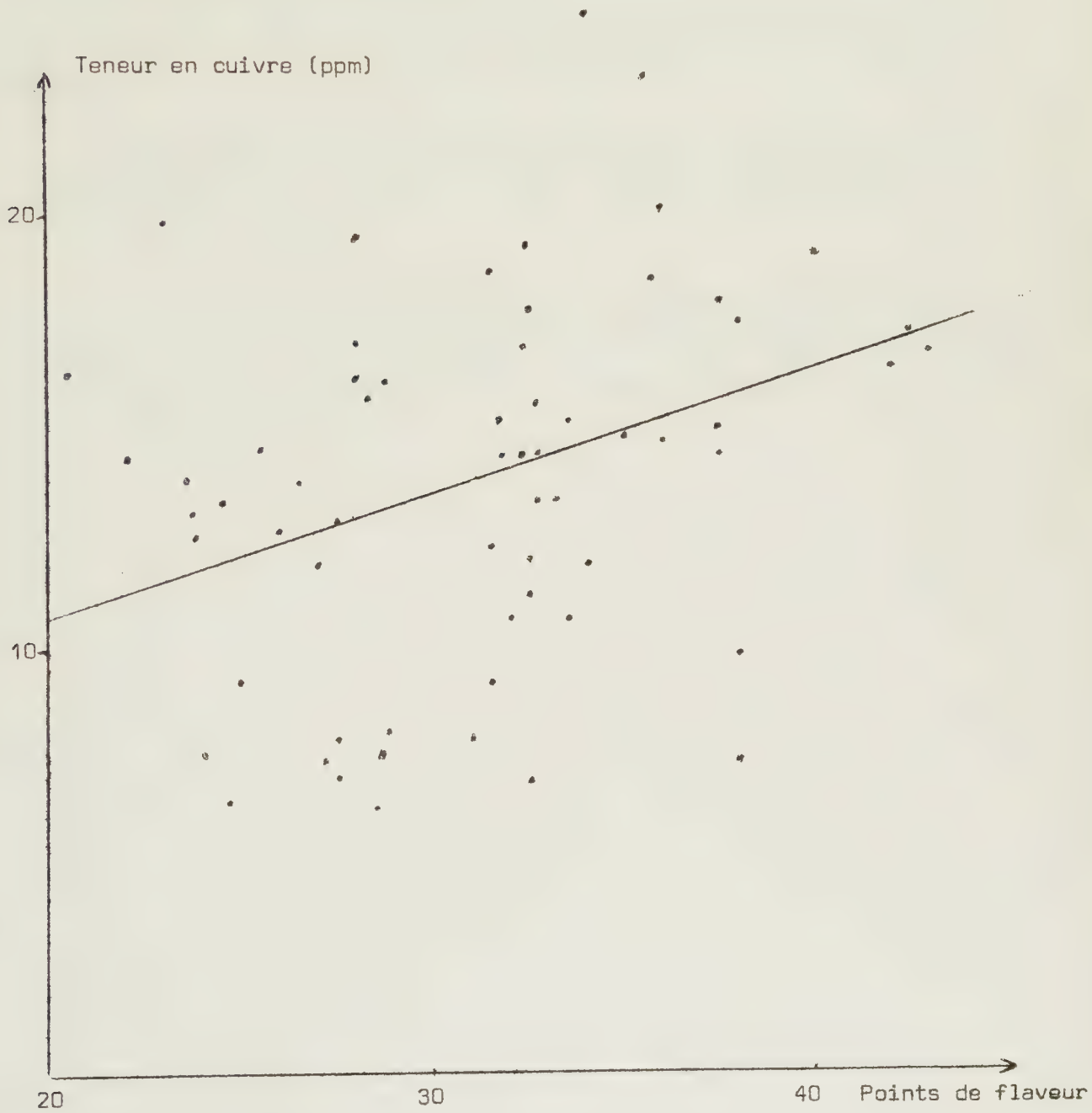
Ce schéma récapitulatif comprend tous les échantillons des deux concours qui, soit n'ont pas été déclassés, soit ont un coefficient de variation inférieur à 0,40. Cela donne un tableau obtenu à l'aide de 33 et de 43, soit au total 76 meules étudiées.



Enveloppes de la relation cuivre-flaveur pour chaque technologie

On peut aussi représenter par un ajustement analytique, à l'aide de la méthode des moindres carrés, la relation qui existe entre le cuivre et la saveur pour les produits fabriqués dans le cuivre. Mais nous ne devons pas oublier qu'un ajustement de type linéaire ne peut qu'imparfaitement représenter un phénomène dont tous les paramètres, sauf un, ont été écartés.

La pente de l'ajustement global, égale à 0,32 et correspondant aux échantillons des deux concours de 1969 et de 1970, permet de conclure à propos de la relation cuivre-flaveur.



Ajustement - Méthode des moindres carrés - Concours 1969 et 1970

L'étude des résultats et de leurs représentations met en évidence trois points :

- le premier, c'est que, si les meilleurs fromages sont ceux qui sont riches en cuivre, les plus mauvais aussi font partie de ce lot. Toutefois, la tendance du nuage de points permet d'affirmer qu'il y a concordance entre le bon goût et la richesse en cuivre, encore que la limite supérieure de cette loi ne soit pas déterminée.

- le deuxième, c'est que les fromages de "deuxième charge", moins riches en cuivre, sont aussi, d'une façon générale, moins bons que les précédents.

- le troisième, c'est que la fabrication en cuve d'acier inoxydable (fromages pauvres en cuivre) donne des résultats plus homogènes, mais le goût moyen est inférieur.

Ces trois points nécessitent une discussion plus approfondie, que nous allons réaliser dans le chapitre suivant en faisant appel à la biochimie de la maturation. Ils poseront par ailleurs toute une série de problèmes aux professionnels intéressés.

CHAPITRE IV

EXPLICATION TECHNOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DE L'INFLUENCE DU CUIVRE EN FROMAGERIE D'EMMENTAL

Nous avons donc globalement trouvé que les fromages riches en cuivre, issus d'une technologie de fabrication traditionnelle en "chaudières" en cuivre peuvent être supérieurs à ceux fabriqués suivant une technologie moderne dans l'acier inoxydable.

Sans chercher à comparer les deux technologies dans leur ensemble, car d'une technologie à l'autre, il y a beaucoup trop de paramètres qui ont évolué dans des proportions très importantes, nous allons essayer de cerner l'influence du cuivre dans l'ancienne technologie, et éventuellement de mieux définir son action biochimique.

Aussi notre étude va s'articuler suivant le plan suivant :

A - Etapes de l'enrichissement en cuivre pendant la fabrication et répartition du cuivre

B - Inconvénients de l'utilisation du cuivre

- a - Les phénomènes de corrosion
- b - Accidents technologiques dus au cuivre

C - Influence biochimique du cuivre sur la maturation

D - Conclusion

A - Les étapes de l'enrichissement en cuivre dans la fabrication - La répartition du cuivre

Ces étapes peuvent se résumer en deux mots : contact et corrosion. En fait, ces étapes se situent donc seulement dans l'ancienne technologie, puisque la nouvelle technologie, pour des raisons "métallurgiques", a totalement banni le cuivre et ses alliages dans la fabrication du matériel de fromagerie. La littérature, même ancienne, donne des exemples de cette chaîne de contamination du lait entier, puis du produit laitier de transformation, par le cuivre, amené directement par le contenant ou par une contamination extérieure.

Ainsi DAVIES W.L. (13) signalait déjà que, pendant ses traitements de fromagerie, le lait s'enrichissait en cuivre. A son époque où tout le matériel était en cuivre pur ou en cuivre étamé, on notait que l'étamage faisait diminuer la contamination, et que cette contamination faisait intervenir surtout les surfaces de contact. Les échangeurs à plaques, les tuyauteries en cuivre et tous les bronzes de robinetterie étaient considérés comme les principaux agents de contamination. De son côté, WILLIAMS W. (43) a montré que, dans le cas de la fabrication des crèmes ou des beurres, c'est le premier contingent de produit fabriqué, la "tête", qui prend presque toute la contamination, le reste des produits fabriqués au cours d'une même opération se trouvant beaucoup moins enrichi. Les phénomènes de corrosion interviennent dans cette contamination. Mais leur importance justifie un chapitre qui leur sera consacré. De toute façon, la contamination par le cuivre reste le plus souvent une contamination chimique caractérisée par la présence de l'ion Cu^{++}.

Dans les diverses étapes de l'évolution du produit brut, le lait, la contamination par le cuivre prend un donné initial qui, à l'arrivée à la laiterie, reste toujours inférieur à 1 ppm. Dans les baquets où on laisse le lait pendant une nuit, durée de "maturation", la contamination par le cuivre est quasi nulle puisque les baquets sont en bois. Le premier agent de contamination au cours du traitement du produit est constitué par les tuyauteries en cuivre et les robinets divers en alliage à base de cuivre (bronze, etc...). La deuxième contamination vient de la paroi même des cuves, qui a tendance à céder du cuivre au liquide contenu. La troisième source de contamination, c'est le contact du lait avec le matériau cuivre qui entraîne son enrichissement en cet élément. Mais à quelle étape de la fabrication ce phénomène est-il le plus important ?

Nous nous sommes attachés à étudier ce phénomène pendant la transformation de cuves entières de lait en fabrication de fromage d'emmental. Cela nous a conduit à dresser les courbes d'enrichissement suivantes en étudiant la répartition du cuivre entre le caillé et le lactosérum.

Une première idée, qu'il convient de ne pas omettre, c'est que les prises d'essai des dosages ne sont pas nécessairement extraites d'un lot de produit homogène. Pour pallier à cet inconvénient, nous avons vérifié, par des séries de trois prélèvements concomitants, l'identité des résultats obtenus dans une détermination. Après cela, nous avons considéré que l'homogénéité du produit quant au caractère considéré, la teneur en cuivre en l'occurence, était évidente puisque les résultats concordaient.

Notre technique de définition de la répartition du cuivre entre la phase solide (caillé) et la phase liquide (lactosérum), a consisté à doser le cuivre dans ces deux produits au cours de l'évolution technologique.

Nous avons appliqué à ces divers matériaux le dosage par spectrophotométrie d'absorption atomique, ce qui nous a permis d'obtenir, suivant les techniques déjà décrites et avec ou sans minéralisation suivant le cas, le tableau de résultats suivant :

Temps de fabrication en minutes	Produit dosé	Teneur en cuivre en ppm
0	Lait homogénéisé	0,5
60	Lactosérum après décaillage	0,0
60	Caillé correspondant	4,5
120	Lactosérum	0,9
120	Caillé correspondant	7,2
180 (fin de fabrication)	Lactosérum	1,5
180 (fin de fabrication)	Caillé correspondant	11,1
200	Caillé collé à la paroi de la cuve	30,4

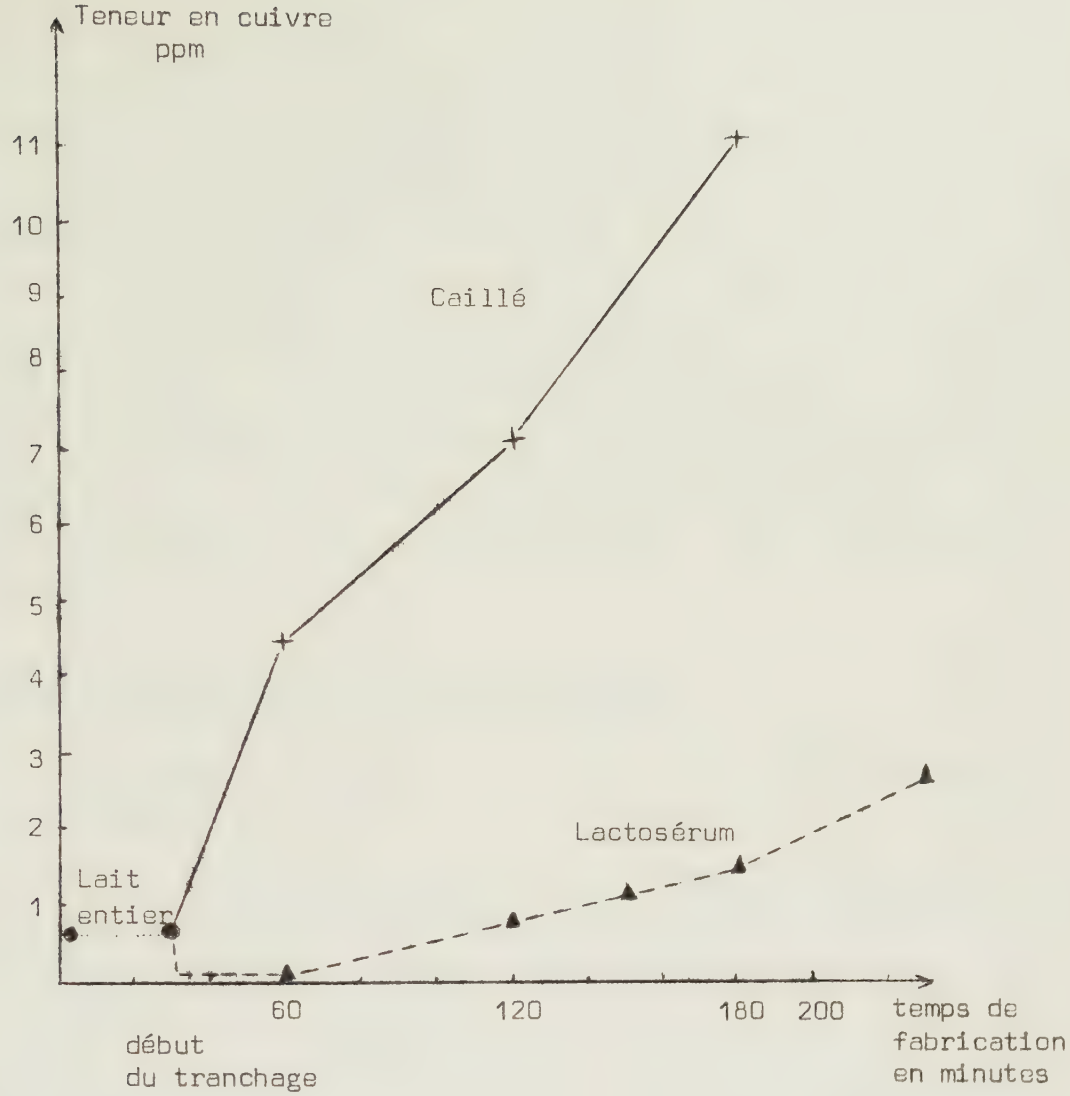
Puis, sur une deuxième série, le tableau suivant

Temps de fabrication en minutes	Produit dosé	Teneur en cuivre en ppm
0	Lait homogénéisé de grand mélange	0,5
120	Lactosérum	0,9
150	Lactosérum à 50°C	1,1
150	Caillé correspondant	14,5
180	Lactosérum (fin de fabrication)	1,4
180	Caillé correspondant	14,9
200	Recherchon (caillé)	22,3
210	Fond de cuve (sérum)	2,6
210	Poussières de caillé	29,9
240	Jus de presse (lactosérum)	2,9

Les résultats de ces deux tableaux, précédés et confirmés par ceux de nombreux autres auteurs, tels SCWAB et OCHEN (36) et KIERMEIER (23) permettent d'affirmer que dès le début du contact entre le lait et la chaudière en cuivre, ce sont les caséines parmi toutes les protéines qui fixent le plus de cuivre puisqu'elles ne sont présentes que dans le caillé. C'est seulement lorsque le caillé est déjà enrichi de plus de 5 ppm que le lactosérum commence à fixer le cuivre. Dans tous les cas, le lactosérum, même en fin de fabrication, est toujours dix fois moins concentré en cuivre que le caillé. Il est à remarquer que leurs concentrations protéiques respectives sont à peu près dans un rapport identique.

Il est curieux aussi de noter que le recherchon est généralement très enrichi en cuivre, et que lejus de presse (lactosérum exclus par pression) est lui aussi plus riche en cuivre que le lactosérum présent dans la chaudière en fin de fabrication. Ce fait intéressant peut s'expliquer par la présence dans le jus de presse d'un composé fixant le cuivre et s'y trouvant à plus forte concentration, soit des protéines solubles, soit des corps gras évacués à cause de la surpression.

Ces deux tableaux permettent de tracer la courbe d'enrichissement du lait en cuivre pendant la fabrication.



Ainsi est-il clair que c'est surtout pendant son séjour dans la cuve en cuivre que le caillé s'enrichit suivant une loi ici représentée. L'étape la plus importante est celle du brassage, pendant laquelle la contamination est double, provenant à la fois du matériel d'agitation et de la cuve. Il convient de ne pas oublier en plus qu'en cours de fabrication, l'acidité augmente, et par conséquent l'attaque chimique sur le cuivre est plus forte. De même tous les autres appareils en laiton enrichissent le milieu en cuivre, et le cuivre libéré se retrouve surtout sur le caillé. En fait, le mécanisme de cette contamination est éclairé par ces résultats donnant la répartition du cuivre entre le caillé et le lactosérum.

Après avoir quitté la chaudière en fin de fabrication (il est généralement pompé), le lactosérum est soit jeté à la rivière, soit utilisé pour l'alimentation animale. Quant à la masse fromagère, elle ne doit plus théoriquement, être en contact avec du cuivre. Donc, son enrichissement ultérieur éventuel ne peut traduire qu'une perte en matière aqueuse, donc une

augmentation relative de la concentration en cuivre. Mais, comme nous le verrons dans le dernier chapitre, le cuivre présent dans le fromage jouera un rôle primordial dans le développement du goût et de l'arôme au cours de la fermentation principale et des fermentations secondaires.

Les courbes d'enrichissement du lait entier,puis obligatoirement du mélange caillé et lactosérum, en fonction du temps et relatives à l'élément cuivre sont explicites d'elles-mêmes. Elles démontrent l'hétérogénéité du milieu quant au phénomène considéré. Elles prouvent que le caillé est beaucoup plus avide de cuivre que la solution de lactosérum. Il est bien entendu que les principaux facteurs qui influent cet enrichissement sont la température et le pH de la solution. L'état initial des surfaces, et leurs impuretés éventuelles peuvent accroître la rapidité de l'enrichissement.

B - Les inconvénients de l'utilisation du cuivre

1 - Les phénomènes de corrosion du cuivre dans la fabrication de l'emmental.

La corrosion du matériau cuivre peut se définir comme sa destruction chimique ou électrochimique par son environnement.

En fait, en industrie fromagère, l'environnement est constitué soit par le lait, soit par le caillé, soit par le lactosérum. Ces trois produits qui évoluent constamment en s'acidifiant au cours du traitement ont des propriétés corrosives importantes. Si le lait frais apparaît tout de même peu mordant, le lait écrémé acide et le lactosérum sont beaucoup plus agressifs, même si leur action est freinée par leur richesse en produits organiques tempérant la réaction acide.

La corrosion du cuivre provient de l'addition de deux phénomènes fondamentalement différents : d'un côté, il y a la corrosion par le produit laitier lui-même, de l'autre, il y a la corrosion intermédiaire par les produits de nettoyage et de rinçage. Aussi y-a-t-il une répartition dans le temps des phénomènes dont l'action globale irréversible conduit surtout à une diminution de l'épaisseur de la couche de métal, lequel s'en va par abrasion, dissolution, ... et divers autres phénomènes physiques ou chimiques.

Dans le cas qui nous intéresse, celui de la corrosion de la chaudière en cuivre, le phénomène se traduit de plusieurs façons :

- la corrosion "chimique" est la conséquence d'une réaction entre la cuve (phase solide) et le lait entier ou caillé (phase liquide) qui se déplace contre elle.

- elle est toujours accompagnée de la corrosion "électrochimique" qui provient surtout des hétérogénéités de la cuve. Ces hétérogénéités de surface entraînent la formation de micro-anodes et de micro-cathodes, et le métal ionisé se déplace entre les deux pôles de ces micropiles, le lait ou le lactosérum jouant le rôle d'électrolyte. L'enrichissement éventuel du liquide en ion Cu^{++} est favorisé par son déplacement continu au cours du brassage.

- enfin, la corrosion avec érosion, car la couche de produits de corrosion à la surface du métal est détruite et emportée par le mouvement abrasif du liquide contenu ou des particules. Cette corrosion est accélérée par la texture et la vitesse des grains de caillé qui constituent les éléments abraseurs.

Il convient maintenant de définir les autres facteurs de la corrosion des chaudières, que nous avons définie comme la corrosion "intermédiaire". L'eau entre en ligne de compte car, au cours du rinçage des cuves, sa dureté surtout intervient sur les propriétés des produits de nettoyage. Ceux-ci interviennent normalement par leurs propriétés chimiques propres, mais trop souvent leur action est accrue par une température ou une durée d'action trop fortes, ou par une concentration trop élevée. WHITTLESTONE, LUTZ et GRAY (44) ont démontré que les produits de désinfection, et en particulier leurs composés chlorés et iodés (iodophores), attaquent le cuivre à partir de concentrations de l'ordre de 50 ppm.

Ainsi le phénomène de l'usure des chaudières en cuivre fait intervenir, dans le domaine de la corrosion, non seulement des facteurs mécaniques, mais encore des facteurs chimiques et électrochimiques ; les produits de nettoyage et de désinfection qui sont souvent accompagnés d'un frottage de la cuve avec un matériau approprié amènent à faire disparaître dans les liquides de rinçage la couche d'oxydes ou de sels qui a pu se former pendant la fabrication du fromage. DUNKLEY et KING (14) ont montré que, quelle que soit la méthode employée, une partie du cuivre passe en solution au moment du nettoyage des cuves, et qu'un fort agent chélatant comme un dérivé de l'E.D.T.A. a pour seul effet d'accroître la corrosion. C'est ce décapage au cours du nettoyage de la cuve qui permet, à chaque nouvelle opération de fabrication, une nouvelle attaque par le produit fabriqué (caillé et lactosérum acides). En fait, les concentrations de cuivre qui sont dissoutes dans le fromage et le lactosérum dépendent surtout, dans le cas d'opérations de nettoyage bien définies et constantes, du "climat" de la fromagerie pendant les périodes de repos : température, humidité, exposition, courants d'air sont autant de facteurs de l'oxydation des cuves entre chaque fabrication.

Les recherches entreprises dans le domaine de la protection du cuivre contre la corrosion se répartissent dans deux directions : l'étamage et la passivation. Toutefois ces deux procédés ne sont pas une solution parfaite puisqu'ils n'arrêtent pas totalement la corrosion, et leur influence technologique sur les processus de la maturation des emmentals n'a jamais été étudiée.

Si l'utilisation de certains aciers inoxydables a diminué l'importance et la rapidité des phénomènes de corrosion dans les cuves de fabrication, elle a soulevé d'autres problèmes. Nous avons montré pourquoi nous déconseillons son emploi généralisé en fabrication pour les fromages du type emmental.

En fonction de l'influence du cuivre sur la maturation et le goût des emmentals, nous pensons que la corrosion doit être un phénomène contrôlé dont l'importance ne peut pas être réfutée en technologie traditionnelle.

2 - Accidents technologiques dus au cuivre.

Parmi les accidents technologiques dus au cuivre, beaucoup ne sont plus que de l'histoire dans la mesure où ils ne se reproduisent pas de nos jours dans des usines à technologie traditionnelle. Ainsi KEILLING (IV) avait-il signalé l'existence de fromages bleus dont la valeur marchande était nulle. La formation de cette couleur était due essentiellement à la présence de "sulfate de cuivre", et aussi à d'autres oxydes et sels cuivreux et cuivriques.

Le deuxième accident technologique assez connu, et encore actuel puisque SCHWAB et OCHEN (36) le signalent encore en 1967 à très grande échelle en Allemagne, c'est la présence de taches brunes dans le fromage. On sait que cette formation est due à l'existence, à l'intérieur même de la pâte, de macrocolonies de bactéries propioniques, lesquelles sont les principaux facteurs de formation de l'arôme. Parmi les paramètres qui influencent l'apparition de ces taches, le plus important paraît l'entreposage du lait chaud dans la chaudière en cuivre. En effet, cet entreposage entraîne non seulement une prolongation du temps de contact lait-cuivre d'au moins 10 heures, mais de plus le phénomène de refroidissement du lait dans la cuve cause des réactions chimiques particulières. Ainsi en bordure de la cuve coule le long de la paroi, une eau de condensation qui s'enrichit en cuivre et en éléments oxydants.

Cet apport de cuivre qualitativement différent de celui dont le fromage s'enrichit en fabrication entraîne pendant l'entreposage des phénomènes d'oxydation des acides gras non saturés qui se traduisent par la formation

de peroxydes. Ainsi le lait entre en fabrication enrichi en peroxydes, en acides gras oxydés, et en cuivre. Le brassage répartit uniformément ces constituants chimiques. Or les essais de laboratoire effectués par SCHWAB et OCHEN (36) ont prouvé que sous certaines conditions telles que richesse en cuivre, forte teneur en oxygène et fortes teneurs en éléments oxydants (quoique non inhibitrices), les bactéries propioniques étaient amenées à donner des pigments bruns. Ainsi se trouve logiquement expliquée la formation de ces taches brunes dont la répartition à l'intérieur du fromage, sous forme d'une zone de ceinture à 3 cm de la couche externe, confirme cette hypothèse. La technologie moderne, en supprimant l'entreposage du lait dans la cuve en cuivre, supprime d'ailleurs cet éventuel ennui technologique.

Un troisième inconvénient technologique dû au cuivre, et qui se reproduit assez souvent, provient du recherchon. Le recherchon, c'est cette petite quantité de caillé que le fromager récupère au fond de la cuve après avoir installé son fromage dans le moule. Il est en général très enrichi en cuivre, et parfois son séjour prolongé dans le bain de sérum lui donne des caractéristiques particulières. Théoriquement, ce recherchon doit être placé dans la toile et soudé au reste du caillé sur le pourtour extérieur. Parfois le fromager, pris par le temps, ne place pas intimement son recherchon dans la masse du caillé. Il s'ensuit un lieu de moindre résistance de la croûte du fromage, et par la suite une évolution particulière et un déclassement éventuel de la meule entière.

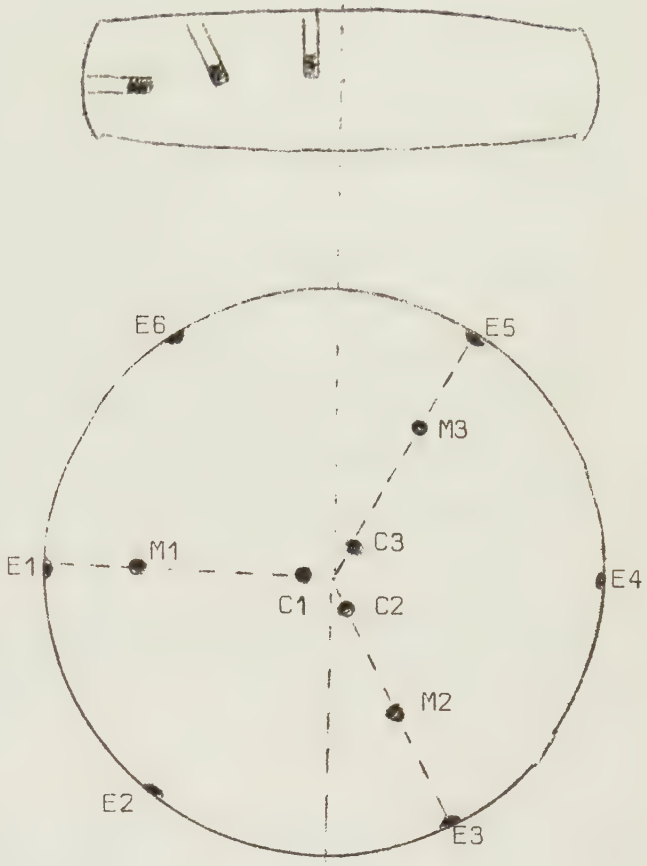
Il nous a été donné de notre côté de rencontrer un accident technologique de cet ordre dans une laiterie fabriquant des emmentals que nous avons visitée. Le fromage, qui a été ouvert devant nous, était un fromage fendu au centre de la meule, d'une fente profonde de 10 cm, large de 3cm.

La fente s'était produite en cave chaude, comme s'il y avait eu là un nouveau départ en fermentation. La croûte et la pâte paraissaient normales. Le goût du fromage était des meilleurs, avec l'arôme de "noisette" bien développé. Nous avons été amenés à prélever un certain nombre d'échantillons de ce fromage de façon à les analyser. Notre méthode de prélèvement a été la plus logique et la plus homogène possible. Elle est décrite ci-après et a été réalisée à la sonde.

Le dosage du cuivre a été réalisé au laboratoire par la méthode déjà décrite ici. Tous les échantillons ont été dosés en double (valeur d'une prise d'essai de l'ordre de 1 gramme) et nous sommes donc sûrs des résultats trouvés.

Répartition du cuivre dans la masse du fromage

Echantillon E1 : 15,9 ppm
" E2 : 16,2 ppm
" E3 : 14,0 ppm
" E4 : 13,1 ppm
" E5 : 15,7 ppm
" E6 : 16,2 ppm
" M1 : 15,7 ppm
" M2 : 13,7 ppm
" M3 : 15,3 ppm
" C1 : 46 ppm
" C2 : 20,7 ppm
" C3 : 20,9 ppm



Les résultats prouvent que le gonflement et l'éclatement du fromage sont dus à un enrichissement anormal et localisé en cuivre. On ne peut expliquer logiquement cet enrichissement que par un "recherchon" très contaminé par le cuivre qui a dû être posé au centre du fromage au moment du moulage.

Enfin, il apparaît aux résultats du dosage du cuivre que ce fromage, par rapport à cet élément, n'est pas homogène. En effet, les différences entre les concentrations en cuivre des divers prélèvements sont trop fortes (de l'ordre de 2,5 ppm) par rapport aux déterminations identiques réalisées sur d'autres fromages pour qu'on puisse les attribuer au hasard seul ; l'hétérogénéité ainsi mise en évidence ne peut tout de même pas s'expliquer technologiquement avec les données que nous possédons, même si elle paraît fort intéressante.

Dans tous les accidents et inconvénients que nous venons de répertorier, il y a un facteur commun : l'erreur humaine. C'est le fromager qui utilisant un goupillon en cuivre, a enrichi tellement son produit, que celui-ci est devenu bleu. C'est le fromager qui, débordé par un arrivage de lait trop important, l'a entreposé directement dans la chaudière au lieu de le conserver la nuit dans les baquets de maturation traditionnellement en bois. C'est aussi le fromager qui a laissé le recherchon s'enrichir anormalement.

Tous ces inconvénients peuvent donc être évités par un fromager conscient de leur existence et de ses responsabilités. Ils ne peuvent pas être imputés directement à l'emploi traditionnel de la cuve de fabrication en cuivre.

C - Influence biochimique du cuivre sur la maturation des fromages d'emmentals

- Préambule

Le problème de la maturation du fromage d'emmental, sous l'aspect que nous allons envisager, ne peut être qu'effleuré.

En effet, les facteurs et les paramètres sont tellement nombreux, qu'il est impossible de simplifier ou de schématiser. Aussi devons-nous prévenir que dans ce chapitre, lorsque nous aborderons un paramètre, qu'il soit d'ordre chimique, physique ou biochimique, c'est volontairement que nous oublierons les autres. Même si un certain nombre de phénomènes sont ainsi déformés, il nous faut admettre toutefois que cette forme de raisonnement est la seule qui s'applique à ce problème et qui soit logique dans le cadre du sujet traité, l'influence du cuivre.

- Introduction

L'affinage doit se considérer comme une maturation biologique dont les principaux facteurs sont les suivants :

- les enzymes présents dans le milieu
- le milieu réactionnel et ses caractéristiques chimiques et physiques
- les microorganismes du milieu,

ainsi que les diverses interactions de ces facteurs les uns sur les autres.

Cette maturation biologique se traduit surtout par une modification de l'aspect, de la texture et de la consistance du caillé, qui devient fromage, et par un développement de toutes les caractéristiques de saveur.

Bien sûr, l'évolution de la maturation dépend avant tout de l'état du caillé, en particulier de ses caractéristiques chimiques et physiques, qui sont fonction surtout de son histoire technologique. Nous allons voir comment l'élément cuivre peut agir dans cette suite de réactions complexes et avoir pour conséquence directe une action sur le goût des fromages.

1 - Facteurs de l'affinage.

Parmi les enzymes responsables de l'affinage, il convient de citer par ordre chronologique :

- la présure et son action protéolytique, qui se manifeste, d'après

SCHORMÜLLER (VIII) de deux façons fondamentalement différentes : dès le début de la coagulation du lait, une première réaction très rapide libère 2 % de l'azote non protéique et affecte l'α-caséine. La deuxième réaction commence la décomposition protéolytique. Elle est susceptible de se prolonger très longtemps dans le fromage même, quoique à un degré moindre. Dans le cas de l'emmental, cette action affecte surtout l'α-caséine, quoique elle s'applique aussi à la β.

- les enzymes du lait et des microorganismes laitiers naturellement présents ou ensemencés volontairement dans le milieu, et en particulier :
- les protéases, qui participent à la protéolyse
- les lipases, qui participent à la lipolyse
- les décarboxylases, responsables de la formation des "yeux"
- des enzymes spécifiques entrant en jeu dans les réactions chimiques de la formation de l'arôme.

Il convient de noter à ce propos que ces enzymes n'agissent pas en même temps, mais que leurs actions sont définies chronologiquement en fonction des variations physicochimiques du milieu (pH, température, humidité, etc...)

Quant aux principaux germes qui sont actuellement utilisés dans les levains de bactéries lactiques, ajoutés au lait en même temps que la présure, nous pouvons les résumer dans la liste suivante

- Streptococcus, thermophilus et lactis
- Lactobacillus, casei et bulgaricus
- Propionibacteria, surtout genre shermanii.

Ce sont surtout eux qui, par leur développement dans le milieu, modifient certains constituants chimiques grâce à leur équipement enzymatique.

2 - Produits de l'affinage : les constituants de la flaveur.

Une première approche du problème consiste pour nous à présenter dans son analyse chimique macroscopique le tableau dressé par HARPER des divers constituants séparés uniquement par une technique d'analyse chimique, la distillation sous vide :

Constituants de la flaveur

Constituants du goût (non volatils)	Constituants de l'arôme (volatils)
- acide lactique	- acides gras
- acides aminés	- aldéhydes
- acides cétoniques	- cétones
- acides non volatils	- alcools
- amines non volatiles	- amines
- sel	- esters

Ces divers composés ont tous pour origine les éléments du caillé de fromagerie et les substances occluses, c'est-à-dire les divers constituants protéiques (surtout les caséines) lipidiques (graisses du lait) et glucidiques (surtout lactose).

3 - Relation entre le cuivre et les composants de la flaveur.

Diverses voies métaboliques permettent de passer des composés initiaux aux composés terminaux. Ces voies sont bien sûr des voies biochimiques dont SCHORMÜLLER (VIII) a défini le détail dans la majorité des cas. Toutefois on comprend que, dans le cadre de ce métabolisme général, de nombreuses interrelations sont possibles. Le cuivre, oligoélément ou élément macroscopique, peut intervenir dans cet ensemble de phénomènes non seulement au niveau du développement microbien, mais encore au niveau des activités enzymatiques. Si nous admettons pour chaque produit un "pool", ce "pool" peut être plus ou moins important selon que les réactions de synthèse et de catabolisme vont à la même vitesse ou se bloquent par un mécanisme où le cuivre peut intervenir.

Les débuts d'utilisation de l'acier inoxydable aux Etats-Unis, dans l'après guerre, ont amené les chercheurs à se poser le problème de l'utilisation du cuivre en fromagerie d'emmental. Ainsi MUELLER, NELSON, WOOD (32) ont-ils essayé de mettre en évidence l'influence du cuivre sur le développement des trois germes les plus employés comme levains, c'est-à-dire les streptocoques, les lactobacilles et les propionibactéries, de même que sur leurs principaux produits métaboliques, respectivement l'acidité totale, l'acidité lactique, l'acidité volatile et carbonique. Si les résultats varient très peu pour les streptocoques et les lactobacilles, l'influence du cuivre, dans l'échelle 0-24 ppm, sur les propioniques est beaucoup plus grande ; non seulement la culture des bactéries se développe moins vite et moins bien, mais en plus, il y a un retard marqué à la formation de CO_2 et d'acides volatils. Toutefois les valeurs terminales d'acidité carbonique et

et volatile, ainsi que le rapport entre acide acétique et acide propionique sont indépendants de la concentration en cuivre. Les essais de technologie réalisés en usine ont donné, sur trois fromages, les résultats suivants :

	Essai I	Essai II	Essai III
Cuivre (ppm)	0-0,5	7,5-8,0	18
Humidité (%)	38,1	37,7	37,1
pH 7e jour	5,35	5,30	5,25
14e jour	5,48	5,45	5,30
39e jour	6,00	5,90	6,00
88e jour	6,15	6,00	-
Acidité relative volatile 88e jour (en ml NaOH 0,1 N)	37,6	41,7	8,6
Caractéristiques du fromage			
Corps et texture	Bon	Bon	Mauvais
Flaveur	Bon	Excellent	Mauvais
Ouverture	Bon	Bon	Mauvais

Ils conclurent de ces résultats que 18 ppm de cuivre étaient défavorables à l'affinage, et que 8 ppm était l'ordre de grandeur à recommander. En fait, leurs résultats étaient difficiles à interpréter car ils ne pouvaient pas tenir compte du fait que le milieu réactionnel et de croissance n'était pas le même au laboratoire et en pratique, d'autant plus que les trois souches pouvaient être sensibles à diverses interactions.

Ainsi était mise en évidence tout de même l'action du cuivre sur les propioniques, facteurs du gonflement du fromage et de la formation des yeux suivant la réaction chimique globale :

acide lactique $\longrightarrow$ acide acétique + acide propionique + $CO_2\uparrow$

ou partielle

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH \longrightarrow CH_3\text{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}\text{-}H + CO_2\uparrow$$

acide pyruvique — acétaldéhyde

Mais en fait, au début de la maturation, ce sont les bactéries lactiques qui décomposent et acidifient le lactose suivant un processus qui passe nécessairement par le stade acide pyruvique et dont le schéma général a été donné par SCHORMÜLLER (VIII).

Lorsque les bactéries propioniques prennent le relais, c'est l'acide propionique qui est formé en plus grande quantité, surtout à partir de l'acide lactique, ainsi qu'un peu d'acide acétique.

KURTZ et col. (29) ont étudié le mécanisme de cette formation. Ils ont trouvé que le maximum d'acide propionique formé correspondait au maximum de bactéries propioniques présentes dans le milieu. Ils ont pu effectuer une cinétique de la réaction, et trouver que en fonction du pH, l'optimum du nombre de bactéries varie dans le rapport de 1 à 50 en valeur absolue et n'est pas obtenu pour un âge fixé du fromage, mais varie dans des limites allant de 6 à 13 semaines. C'est le pH 5,4 qui permet le meilleur épanouissement des propioniques et la plus forte production d'acide. En continuant leurs investigations, ces auteurs ont mis en évidence que dans les conditions de fabrication, le rapport $\frac{\text{ac.propionique}}{\text{ac. acétique}}$ varie seulement entre 1,90 et 2,14, ce qui permet de dire qu'il est biologiquement constant. Enfin, en essayant de mieux définir les divers composants de l'arôme, ils ont obtenu le tableau de résultats suivant donnant un rapport entre la flaveur et la composition chimique des acides gras libres.

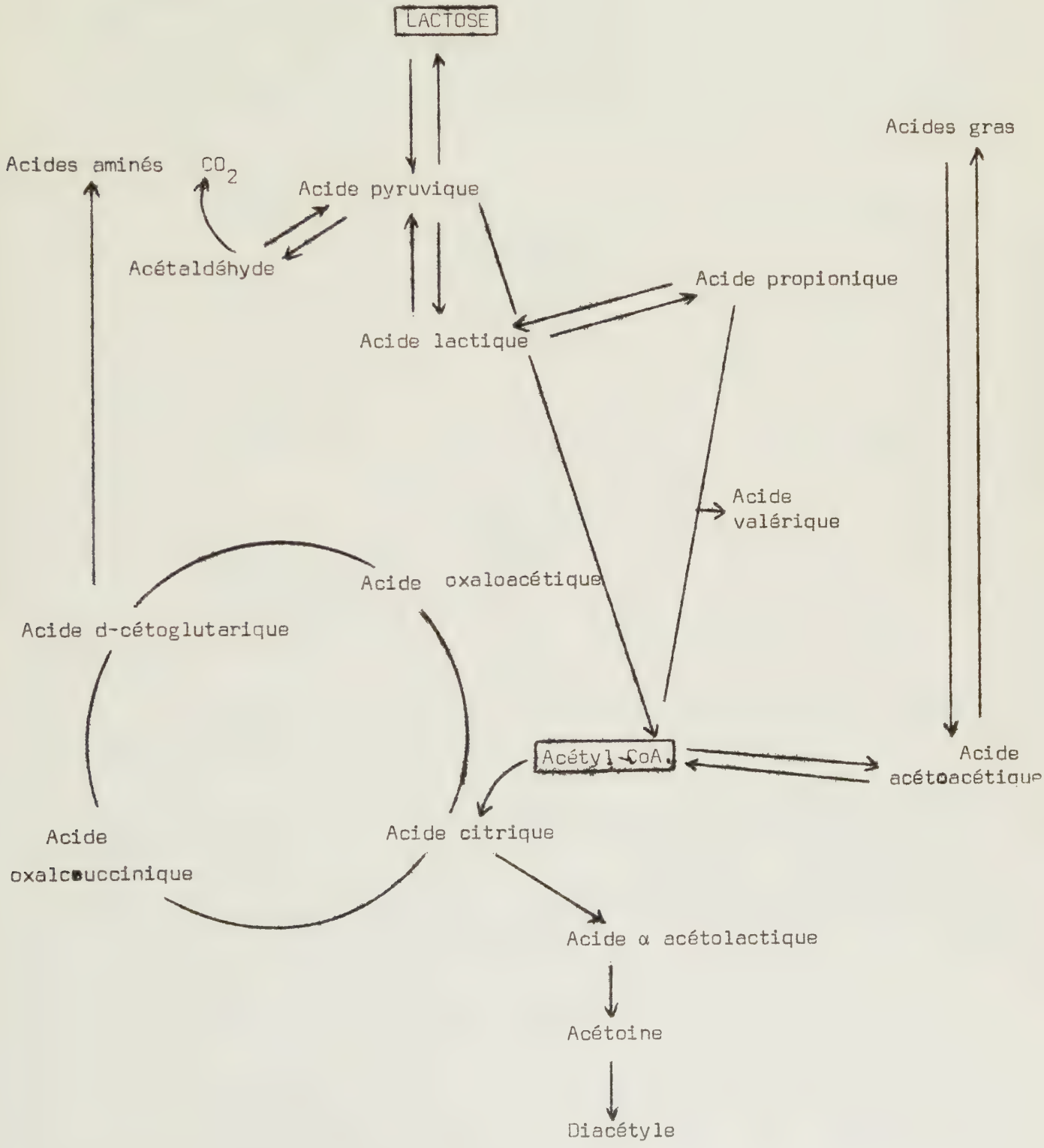
Fromage n°	Age en semaines	Propionique µM/g	Acétique µM/g	Butyrique µM/g	C5 et supérieurs	Douceur	Goût de flaveur	
							noisette	différente
5	49	29	34	6	18	moyenne	0	0
4	49	38	35	4	16	faible	0	0
1	49	43	35	7	24	moyenne	0	0
14	24	44	40	34	24	faible	0	malté et grossière
3	49	45	33	6	31	moyenne	0	0
20	-	48	58	6	35	faible	faible	acide
17 *	-	51	59	3	17	moyenne	moyen	0
2	49	53	37	4	24	forte	0	0
19	-	57	72	3	17	faible	0	0
12 *	39	64	42	5	19	moyenne	moyen	0
16	-	66	68	2	16	0	0	0
11 *	39	72	45	5	33	moyenne	moyen	0
18	-	77	75	3	13	moyenne	moyen	grossière
6	39	89	44	11	32	-	-	pourrie
10	39	90	43	6	44	moyenne	faible	0

* fromages classés en catégorie "supérieure"

De ce tableau, il est impossible de tirer une loi générale ; beaucoup d'autres composés chimiques influencent le goût. Toutefois il est évident que le goût de noisette est obtenu seulement pour des fromages dans lesquels l'acidité propionique est forte, l'acidité acétique un peu moins. De plus, ce tableau met en évidence la complexité de la formation du goût et de l'arôme lorsqu'on néglige certains paramètres. Mais les conclusions de KURTZ et col. (29) sont formelles : l'acide propionique seul ne donne pas le goût de noisette. Néanmoins, le seuil de 5 mg/g, soit 67 micromoles/gramme, est considéré comme la limite inférieure permettant d'obtenir un bon goût de l'emmental. Or on considère là le fromage en fin d'affinage, ce qui veut dire qu'entre temps la concentration en acide propionique doit être plus forte. HARPER (18) de son côté signale que les meilleurs fromages possèdent le plus fort rapport $\frac{\text{acide propionique}}{\text{acide acétique}}$. Il insiste aussi sur l'importance de l'équilibre acides gras libres-acides aminés. Ainsi le rapport $\frac{\text{proline (en mg/g)}}{\text{propionique (en mg/g}}$ est-il voisin de 2 dans les meilleurs fromages.
Deux autres composants de l'arôme, dont nous n'avons pas encore parlé, nous intéressent dans l'analyse de l'arôme et du bon goût, l'acétoïne et le diacétyle.

SCHORMÜLLER (VIII) donne dans l'emmental pour ces substances, des concentrations respectives de 3,50 et 0,25 mg pour 100 g de fromage. Malgré leur faible pourcentage, ces substances ont une grande importance dans la formation de l'arôme. D'une façon générale, il est admis, d'après KEENAN et BILLS (22) que ces deux produits ne proviennent pas du seul métabolisme des sucres (lactose) mais aussi de celui du citrate du milieu, ce qui rejoint le schéma proposé par SCHORMÜLLER (VIII). Or la fermentation du citrate produit du pyruvate sans l'apport de nicotinamide dinucléotide réduit, tant et si bien que ce sont des produits différents de l'acide lactique qui sont obtenus. Ainsi s'explique, dans la formation de l'arôme, que, dès que la dégradation du lactose diminue, au voisinage de pH 5, c'est la fermentation du citrate qui maintient un "pool" de pyruvate. Le pyruvate, quelles que soient ses origines métaboliques, constitue donc le "chef d'orchestre" de la formation de l'arôme, car toutes les voies métaboliques de l'affinage passent par son intermédiaire. Ainsi est mis en évidence le rôle biochimique des bactéries propioniques qui sont capables, grâce à leur équipement enzymatique approprié, de coordonner à partir du pyruvate la formation des plus importants constituants du goût et de l'arôme des emmentals. Ces bactéries agissent par l'intermédiaire de voies différentes du métabolisme fermentaire et entraînent la production d'acides gras volatils ou non et même, d'après CARINI et col (10) de traces de diacétyle.

Toutefois KIERMIER (23), après avoir, lui aussi, dosé macroscopiquement le cuivre dans les fromages, s'est ensuite penché sur l'influence biochimique du cuivre dans les phénomènes de la maturation. Il est bien sûr arrivé au "pool" de l'acide pyruvique et a d'abord essayé de définir le contenu de diverses espèces de fromages en cet acide.



Biochimie du lactose dans le fromage.

KIERMIER (25) a ainsi démontré les points très importants suivants :

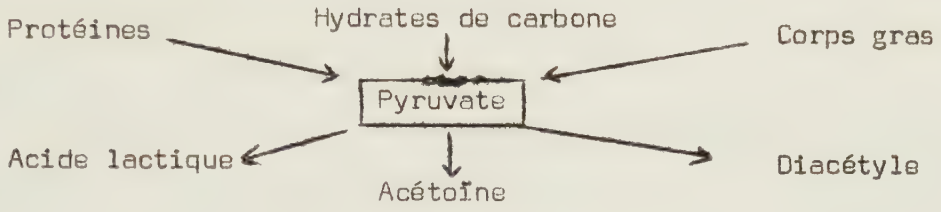
- la teneur en acide pyruvique du camembert varie au cours de la maturation

- l'emmental de plus de 7 mois d'âge ne montre pas de relation entre la maturation et la teneur en acide pyruvique

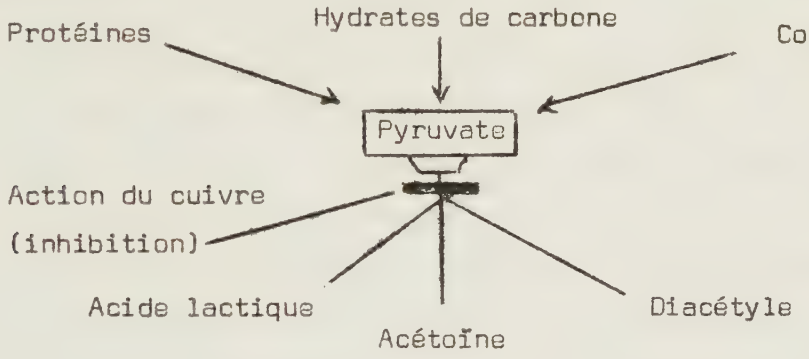
- chaque variété de fromage possède une teneur particulière en acide pyruvique. Ceux des fromages les plus riches en cuivre, comme l'emmental, sont aussi les plus riches en acide pyruvique.

Dans un premier temps, ces résultats partiels permettent de dresser les tableaux généraux suivants du métabolisme de la maturation des fromages.

1 - Fromage sans cuivre



2 - Fromage avec cuivre



Le cuivre favorise donc l'accumulation du pyruvate à une certaine concentration en bloquant certaines de ses voies métaboliques.

Pour confirmer cette hypothèse, et l'étayer par une meilleure compréhension biochimique, KIERMEIER (26) a poursuivi ses recherches sur l'influence du cuivre sur une 2-acide cétonique carboxylase, la pyruvate décarboxylase ou P.D.C., responsable de la réaction de décarboxylation de l'acide pyruvique suivant le schéma irréversible :

$$CH_3\text{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}\text{-}COOH \xrightarrow{P.D.C.} CH_3\text{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}\text{-}H + CO_2\uparrow$$

acide pyruvique → acétaldéhyde + gaz carbonique

Or, cet enzyme est directement responsable, par la formation d'acétaldéhyde actif, de celle aussi d'acétoïne et de diacétyle. Par diverses analyses "in vitro" et "in vivo", KIERMEIER a finalement montré que :

Des doses croissantes de cuivre inhibent la P.D.C., avec un seuil de 1.10^{-6} moles de Cu/litre ; cette inhibition est non compétitive. Les acides aminés soufrés, comme la cystéine ou le glutathion, accroissent cette inhibition. Le cuivre inhibe "in vitro" la formation d'acétoïne à la concentration de 1.10^{-5} moles de Cu/l.

Ainsi était démontré que le cuivre inhibait, dans le fromage, la formation d'un composé issu du pyruvate par action de la P.D.C., c'est-à-dire l'acétaldéhyde sous sa forme active. Cette inhibition se traduit chimiquement par le maintien,en présence de cuivre, des taux d'acétoïne et de diacétyle à des valeurs moyennes obtenues par la seule autre voie métabolique, celle du citrate et de l'acide α-acéto-lactique.

4 - Conclusion

De cette brève étude, et qui laisse volontairement de côté beaucoup de phénomènes de la maturation et de l'affinage, nous pouvons conclure que le cuivre possède une influence complexe sur la formation du goût et de l'arôme des emmentals. Nous avons prouvé, après BURKHALTER (8), que ses conclusions sont encore valables de nos jours, c'est-à-dire que la fabrication de l'emmental dans le cuivre peut donner un produit de qualité supérieure au produit fabriqué dans l'acier inoxydable.

Nous avons réussi à comprendre, au moins partiellement, comment le cuivre agit sur la technologie fromagère :

- d'un côté, il ralentit la vitesse de développement des bactéries propioniques et agit ainsi indirectement sur la vitesse de gonflement des fromages en fermentation principale, mais il permet tout de même une production d'acide propionique suffisante.

- d'un autre côté, il agit sur l'évolution ou l'apparition des produits responsables du goût ou de l'arôme, et en particulier il maintient dans le fromage une forte teneur en pyruvate car il inhibe sa transformation en acétoïne et diacétyle.

Ajoutés aux résultats des tests organoleptiques que nous avons effectués, ces faits, quoique partiels, sont cependant assez clairs pour obliger les industriels concernés à revoir leur politique en matière de cuve de fabrication. Il serait vain en effet de continuer à promouvoir la première étape de la fabrication dans l'inoxydable, qui par ailleurs convient parfaitement à toutes les autres opérations technologiques, puisqu'il est maintenant établi que cette technologie est défavorable au goût et à l'arôme des emmentals. L'intérêt économique de l'emploi du cuivre en fabrication est si évident pour maintenir une qualité organoleptique, facteur principal de la

vente de l'emmental, Roi des fromages et avant tout "fromage de bouche", que nous pensons, en terminant ce travail, n'avoir pas appliqué en vain nos connaissances à un problème complexe, qui, s'il n'est pas complètement éclairé, a maintenant défini sa solution pratique.

RESUME et CONCLUSIONS

Notre travail a constitué tout d'abord à mettre au pcint la technique de dosage du cuivre par spectrophotométrie d'absorption atomique. Ces premiers travaux ont permis l'étalonnage de l'appareil et ont révélé les principaux avantages de la méthode : spécificité, sensibilité, rapidité et simplicité d'exécution.

Le dosage du cuivre dans certains produits alimentaires a permis de démontrer que les produits analysés ne présentaient aucune toxicité et que les normes légales des teneurs en cuivre étaient respectées pour tous les produits reverdis au sulfate de cuivre. Ces résultats n'ont pas nécessité d'approfondissement supplémentaire.

Nous nous sommes intéressés au dosage du cuivre dans divers produits laitiers crus ou enrichis par un traitement technologique. Les premiers résultats de nos dosages sur le lait de vaches de la race "Montbéliarde" ont confirmé ceux obtenus pour d'autres animaux de la même espèce. L'importance économique du cuivre en technologie laitière, où il est responsable des phénomènes d'oxydation et de rancissement du lait, nous a conduit à y préciser la répartition du cuivre . Le cuivre a été dosé sur les diverses fractions du lait, crème, caséine, lactosérum, puis sur les diverses protéines solubles du lait frais séparées par filtration sur colonne. La technique analytique ainsi mise au point pour le dosage du cuivre est applicable sans modifications à d'autres anions ou cations. Les résultats obtenus prouvent que le cuivre influence l'équilibre protéique du lactosérum, et il conviendrait de les compléter maintenant par une étude analogue réalisée sur des lactosérums de fromagerie. L'étude biochimique de la fraction de cuivre utilisable par le jeune veau dans le lait de sa mère peut constituer un prolongement de nos résultats, puisque nous avons mis en évidence des relations qualitatives et quantitatives entre le cuivre et les protéines du lactosérum.

Mais l'application principale de nos travaux se situe dans le domaine de la technologie laitière. Cet aspect se justifie par les conséquences économiques de la présence du cuivre dans le lait et les produits laitiers sujets au rancissement car il est considéré comme premier responsable de

mauvaises flaveurs dans les laits, beurres, crèmes. Nous avons dosé systématiquement le cuivre sur de fortes séries de meules de fromages d'emmental. Nous avons mené en parallèle sur nos échantillons, une étude statistique de leurs propriétés organoleptiques. La comparaison des deux séries de résultats a permis de conclure que le cuivre constitue le principal facteur de la bonne flaveur des emmentals ; cela nous a conduit à étudier aussi le phénomène d'enrichissement du milieu en cuivre lors de la fabrication des fromages d'emmental, ainsi que ses conséquences technologiques, puis à envisager son action enzymatique sur les réactions biochimiques du métabolisme, de la maturation et de l'affinage des fromages. Notre conclusion globale, réhabilitant l'utilisation du cuivre en cuve de fabrication de l'emmental, constitue un fait technologique nouveau qui devrait entraîner des conséquences pour les professionnels concernés. L'évolution de la fromagerie vers la cuve de fabrication en acier inoxydable doit être revue. Il conviendrait peut être maintenant de rechercher sous quelle forme apporter, dans le cas de la technologie dans l'acier inoxydable, un cuivre actif au niveau enzymatique. En effet, les nouveaux procédés de fabrication en continu se prêtent mal, par leur conception même et par la masse de produit traité, à l'utilisation de matériel en cuivre. Nos résultats, quoique partiels, nous amènent à penser qu'un apport de cuivre, sous la forme d'un complexe cuivre-protéines, constituerait une solution pratique et élégante à ce nouveau problème et permettrait de maintenir la qualité organoleptique des fromages concernés.

BIBLIOGRAPHIE

Ouvrages généraux

I - DAVIES J.G. - Cheese Vol. 1, Basic Technology, J. et A. CHURCHILL, London, 1965.

II - PEPE P. et TISSERAND-PERRIER - Méthodes statistiques dans les sciences humaines, Masson, 1962.

III - KEILLING J., Cours de Technologie des I.A.A. - I.B.A.N.A., Dijon.

IV - Mc KENZIE H.A., Milk proteins, 2 vol., Academic Press, 1970 et 1971.

V - PETER A., Manuel de fabrication du fromage d'emmental. Edition des Hoirs, C.J. Wyss S.A., Berne Suisse, 1960.

VI - PHARMACIA FINE CHEMICALS, Théorie et pratique de la filtration sur gel Séphadex, UPPSALA, Suède 1964.

VII - PINTA M., Spectrophotométrie d'absorption atomique - Application à l'analyse chimique, 1971, 2 vol., Masson et Orstom Editeurs.

VIII - SCHORMÜLLER, The Chemistry and Biochemistry of cheese ripenning. Advances in Food research. Vol. 16, 1968, p. 231 à 313, Academic Press, London, New-York.

IX - VALLEE et WACKER W. "The Proteins", vol. 5 : Metalloproteins. 2ème Ed. Academic Press, 1970.

Autres références

1 - ALIFAX R. et BEJAMBES M.
- Ann. Technol., 1956, 4, 619.

2 - ARMSTRONG B.C. et DILL C.W.
- J. of Dairy Sciences, 1966, 51, 1851.

3 - ARMSTRONG J.M., Mc KENZIE H.A. et SAWYER W.H.
- Biochim. Biophys. Acta, 1967, 147, 60.

4 - ARMSTRONG J.M., HOPPER K.E., Mc KENZIE H.A. et MURPHY W.H.
- Biochim. Biophys. Acta, 1970, 214, 419.

5 - AULAKH J.S., et STINE C.M.
- J. of Dairy Science, 1969, 54, 1605.

6 - BERTOLANI G. et GAVIOLI E.
- Scienza e Tecnica lattiero-casearia, 1969, 20, 315.

7 - BULL

- J. Amer. Chem. Soc., 1946, 68, 746.

8 - BURKHALTER G.

- Schweiz. Milchztg., 1956, 82, 313.

9 - BUTHIEAU A.M., ILARI J.L. et LACOME A.

- Mémoire de 3ème Année I.B.A.N.A., Biochimie cellulaire 1969, I.B.A.N.A., Dijon

10 - CARINI S.

- Scienza e tecnica lattiero-casearia, 1971, 22, 335.

11 - CERBULIS J.

- Milchwissenschaft, 1970, 25, 76.

12 - CLUSKEY F.J., THOMAS E.G. et COULTER S.T.

- J. of Dairy Science, 1969, 52, 1181.

13 - DAVIES W.L.

- J. of Dairy Research, 1931, 3, 86.

14 - DUNKLEY W.L. et KING R.L.

- J. of Dairy Science, 1958, 42, 480.

15 - GIRARD et ROUSSELET

- Ann. Pharm. Franç., 1967, 25, 353.

16 - GOLDING et FEILMAN

- J. Soc. Chem. Ind., 1905, 24, 1285.

17 - HAASE G., et DUNKLEY W.L.

- Milchwissenschaft, 1970, 25, 656.

18 - HARPER W.J.

- J. of Dairy Science, 1959, 42, 207.

19 - HIDALGO J. et HANSEN P.M.T.

- J. of Dairy Science, 1970, 54, 1270.

20 - ILARI J.L.

- Revue laitière française, 1972, 299, 503

21 - IRONS L. et JONES M.

- Proc. Soc. Analyt. Chem., 1969, 5.

22 - KEENAN T.W. et BILLS D.D.

- J. of Dairy Science, 1968, 51, 1561.

23 - KIERMEIER F. et WEISS G.

- Zeitschriftt Für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 1969, 141,

24 - KIERMEIER F. et JACKL H.
- Diese Zeitung, 1961, 115, 493

25 - KIERMEIER F. et KYREN H.J.
- Zeitschriftt für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 1971, 147, 77.

26 - KIERMEIER F., KYREN H.J.
- Zeitschriftt für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 1971, 147, 187.

27 - KING R.L. et col.
- J. Dairy Science, 1959, 42, 780.

28 - KOPPLE K.D.
- Peptides et acides aminés, p. 21, Ediscience 1968.

29 - KURTZ F.E. et col.
- J. of Dairy Science, 1959, 42, 1008.

30 - MORR C.V., KENKAN D.B., et GOULD I.A.
- J. of Dairy Science, 1964, 47, 621.

31 - MORR et col.
- J. of Dairy Science, 1968, 51, 1155.

32 - MUELLER H.F., NELSON W.O. et WOOD W.A.
- J. of Dairy Science, 1952, 35, 929.

33 - PORAH J., et FLODIN F.
- Nature, 1959, 183, 1657

34 - PREAUX G. et LONTIE R.
- Arch. Int. Physiol. Bioch., 1961, 69, 100.

35 - SAMUELSON
- Milchwissenchaft, 1966, 21, 335.

36 - SCHWAB H. et OCHEN V.
- Die Molkerei-Zeitung welt der Milch, 1969, 23, 233.

37 - SMITH A.C.
- J. of Dairy Science, 1967, 50, 664.

38 - SZUCHET, DERCHINS et JOHNSON P.
- European Polymer Journal, 1965, 1, 271.

39 - UENO Y., YOSA N. et OHASHI S.
- J. Chromatog., 1970, 52, 321.

40 - VAN DE GOGART M. et BEINERT H.

- Analytical Biochemistry, 1967, 20, 325.

41 - VAN DUIN H.

- Fédération Internationale de laiterie, Dublin, Irlande.

42 - VENTURA S. et WHITE J.C.

- Analyst., 1954, 79, 39.

43 - WILLIAMS W.

- J. of Dairy Research, 1931, 3, 92.

44 - WHITTLESTONE W.G., LUTZ P. et GRAY C.

- Australian J. of Dairy Technology, 1964, 19, 88.

Vu et permis d'imprimer

A Dijon , le 19 février 1973

La Présidente de l'Université

Madame F. MORET-BAILLY